

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XLIII, HEFT 1—2
MIT 50 TEXTABBILDUNGEN UND 1 TAFEL
ABGESCHLOSSEN AM 9. NOVEMBER 1953



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1954

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5,
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostentersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLIII. Band

Inhaltsverzeichnis

1.—2. Heft

Ernst Küster in memoriam (Friedl Weber) Seite 1

Abhandlungen

Kuhl, W.: Zeitrasterfilm-Untersuchungen über die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf die Cytoplasmastrukturen, den Plasmogamieablauf und die Zellrestitution bei <i>Actinosphaerium eichhorni</i> Ehrbg.	3
Wiede, Margot: Über den Einfluß pharmakologischer Reize auf das Zellbild der Streifenstücke	63
Essner, E. S.: The Breakdown of Isolated Yolk Granules by Cations	79
Laber, Ilse: Entwicklung und Nekrose einiger kurzlebiger Pflanzenhaare	90
Schittengruber, Brigitte: Stomata fehlen den Blattflecken von <i>Maranta leuconeura</i>	115
Strugger, S.: Die Proplastiden in den jungen Blättern von <i>Agapanthus umbellatus</i> L'Hérit	120

Kurze Mitteilungen

Weber, F., und Griseldis Kenda: Rasche Vakuolenkontraktion in <i>Pulmonaria</i> -Blütenzellen	174
---	-----

Referate.	176
-------------------	-----

Ernst Küster

In memoriam

Am 6. Juli 1955 ist Ernst Küster gestorben, es endete sein arbeitsvolles Leben, das so erfolgreich der Zellforschung gewidmet war. Geistig wird Küster weiterleben, denn die markanten Züge, die er in das Bild der



Zellenlehre eingefügt hat, sind mit ihm nicht ausgelöscht, sie werden leuchten und wirken, solange sich die Wissenschaft um die Rätsel der Lebens-einheit bemüht. Es mag richtig sein, daß kein Mensch unersetzlich ist und daß die Lücken, die der Tod reißt, durch das Leben immer wieder geschlossen werden. Wer mag dies besser gewußt haben als Küster, der erst vor Jahresfrist einen geistvollen Vortrag über Restitution und Regeneration gehalten hat. Lücken und Wunden aber schließen verschieden schwer und ver-

schieden schnell. Und eine Wunde, die lang nicht heilen wird, ist die, die der Protoplasma-Forschung durch den Tod Küsters geschlagen worden ist. Küster selbst muß es, trotz aller seiner Bescheidenheit, gewußt haben, daß der Reichtum an Wissen und Können, den er in einem langen, arbeitsvollen Leben gesammelt und durch eigenes geniales Schaffen wertvoll vermehrt hat, ein einmaliges Phänomen ist, das nicht wiederkommt. Vielleicht ist dieses Wissen um seine Einmaligkeit eine der Triebkräfte, die ihm die Berufung und die Ausdauer gaben, in großen zusammenfassenden Werken wenigstens einen Teil seiner Forscherpersönlichkeit zu erhalten und zu überliefern. So hat er neben Büchern, deren Stoffe auf anderen Gebieten liegen, sein Meisterwerk „Die Pflanzenzelle“ geschaffen, das zuerst 1935 erschien und das in einer zweiten Auflage 1951 erscheinen zu lassen dem damals schon weit über Siebzigjährigen die Energie nicht fehlte. Ist schon in diesen „Vorlesungen über normale und pathologische Zytomorphologie und Zytogenese“ den Ergebnissen der Protoplasmaforschung ein breiter Raum gewährt, so sind andere seiner Bücher dieser Wissenschaft zur Gänze gewidmet, so die Protoplasma-Monographien „Pathologie des Protoplasmas“ (1929) und „Pathologie der Plastiden“ (1937). Die Zeitschrift „Protoplasma“ hat Küster von ihrem Anfang an in selbstloser Weise durch Veröffentlichung zahlreicher eigener Arbeiten und Arbeiten seiner Schüler wie kaum ein anderer gefördert und geehrt, und für das in Vorbereitung stehende Handbuch „Protoplasmatologia“ wollte er eine Reihe von Artikeln bearbeiten, von denen leider nur mehr einer, nämlich der über „Plasmoptyse“, ganz zum Abschluß gekommen ist. So hat neben der „Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie“, die Küster in einer langen Reihe von Bänden selbst herausgegeben hat, kaum eine andere Zeitschrift mehr Ursache und Verpflichtung, des großen Zellforschers Küster in Dankbarkeit zu gedenken.

F. Weber.

**Zeitrafferfilm-Untersuchungen
über die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf
die Cytoplasmastrukturen, den Plasmogamieablauf und die
Zellrestitution bei *Actinosphaerium eichhorni* EHRBG.**

Von

Willi Kuhl

(Unter Mitarbeit von Gertrud Kuhl)

Aus dem Institut für kinematische Zellforschung in Frankfurt a. M.

Mit 12 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. März 1953)

Inhalt	Seite
Einleitung	3
I. Zur Technik der Versuche	4
II. Zentrifugierungsversuche	4
III. Pressungsversuche	25
IV. Kombinierte Versuche	50
V. Zusammenfassung	59
Literatur	61

Einleitung

In zwei vorhergehenden Arbeiten (W. Kuhl 1951, 1953) wurden an der lebenden, experimentell unbeeinflussten polyenergiden Zelle von *Actinosphaerium eichhorni* die Cytoplasmastrukturen der einzelnen Zellregionen und der Zellorganelle beim Ablauf ihrer Funktionen sowie die Mikrodynamik der Plasmogamie und der „temporären Plasmabrücken“ einer Analyse unterzogen, bei der lediglich das „Zeitmoment“ des Beobachters durch Anwendung des Mikrozeitrafferfilms für die Dauer des Filmablaufes geändert wurde.

In den folgenden Ausführungen werden Versuchsergebnisse dargestellt, die durch die Einwirkung zweier verschiedener mechanischer Reize auf lebende *Actinosphaerien* erzielt wurden. Die angestellten Versuche wurden unter Zeitraffung gefilmt und die für die subjektive Beobachtung zu langsam ablaufenden intrazellulären Bewegungsvorgänge dadurch der direkten Beobachtung zugänglich gemacht.

I. Zur Technik der Versuche

Die experimentellen mechanischen Mittel zur Erzielung von Veränderungen an und in der lebenden Zelle waren: 1. Zentrifugierung mit verschiedener Umdrehungszahl und Zeitdauer und 2. Pressung der Zelle in verschiedenem Ausmaße. Von chemischen Versuchen (Änderung des p_H , Anwendung von quellenden und entquellenden Salzlösungen) wurde in dieser Untersuchung aus technisch bedingten Gründen Abstand genommen. Derartige Versuche, in Verbindung mit Zeitrafferfilm-Aufnahmen, sollen so bald wie möglich nachgeholt werden. Zur besseren Abgrenzung der „pseudoindividualen Grenzen“ wurde mehrfach vitale Neutralrotfärbung angewandt, die von den Tieren erstaunlich gut vertragen wurde. Nähere technische Angaben zu Beginn der Abschnitte II und III.

II. Zentrifugierungsversuche

Es wurde eine elektrische Zentrifuge mit maximal 4400 Umdrehungen je Minute verwandt. Der übliche Metallhalter für die Röhrchen wurde derart abgeändert, daß etwa 40 mm lange, unten rundgeschmolzene Glasröhrchen mit einer lichten Weite von 4–5 mm zur Aufnahme des zu zentrifugierenden Materials benutzt werden konnten. Diese kleinen Röhrchen steckten in Metallhülsen, in die sie gerade hineinpaßten. Die jeweilige Umdrehungszahl wurde direkt an der Zentrifugenachse gemessen.

Die Dauer der Zentrifugierung schwankte von 5 bis maximal 30 Minuten. Nach dem Zentrifugieren wurden die Tiere möglichst schnell aus dem Röhrchen unter das Deckglas des Aufnahmepräparates gebracht und sofort unter Zeitraffung gefilmt.

Zentrifugierungsversuche wurden unter zwei Gesichtspunkten angestellt: 1. Fragestellung: Lassen sich die Cytoplasmastrukturen, vor allem das grobvakuolisierte Ektoplasma, verändern und sind die erzielten Veränderungen reversibel oder nicht? 2. Fragestellung: Läßt sich durch das Zentrifugieren der Plasmogamievorgang in irgendeiner Weise beeinflussen, wobei auch die Art der Trennung der verschmolzenen Tiere zu berücksichtigen ist unter Vergleichung mit der unbeeinflussten Plasmogamie?

Cienkowski (1865) gelang die Vereinigung von *Actinosphaerien* an Schnittflächen, die er vorher setzte; es entstanden, nach mehrfacher Wiederholung des Versuches, sehr große Tiere, und zwar bis zu fünf verschmolzenen Sonnentierchen.

Die durch die Änderung des Zeitfaktors ermöglichte langfristige und objektgetreue Beobachtung des Ektoplasma ergab, trotz der „Zusammendrängung“ gegebenenfalls vorhandener mikrodynamischer Vorgänge im Zeitrafferlaufbild, eine erstaunliche Konstanz der Gestalt der ektoplasmatischen Wände der Flüssigkeitsvakuolen. Das zähe Festhalten der Zelle an den Strukturelementen der „Rindenschicht“ führte bei der Analyse der normalen Plasmogamie zu recht verwickelten Auflösungs- und Wiederaufbauerscheinungen (s. W. Kuhl, 1953: die Einstellungen 48 und 52, Abb. 6 und 5). Der Versuch lag nun nahe, die „Wabenwände“ zunächst milden mechanischen Einflüssen auszusetzen, um dadurch vielleicht ein Zusammenfließen der Flüssigkeitsvakuolen oder gar eine Ab-

änderung der gesamten Ektoplasmastruktur zu erzielen; die leicht dosierbare Wirkung der Zentrifugalkraft läßt sich in diesem Sinne dazu benutzen, die *Actinosphaerien* mehr oder weniger fest an den Boden des Röhrchens anzupressen.

Howland (1928) erzielte eine künstliche Plasmogamie mit Sicherheit, wenn zwei oder mehr Tiere in sehr kleinem hängendem Tropfen gegenseitig einen gelinden Druck aufeinander ausübten: erzwungener temporärer Kontakt.

Im „hängenden Tropfen“ kann dieser gegenseitige Druck nur äußerst gering sein, denn es besteht ja die Möglichkeit für die Tiere, nach fast allen Seiten auszuweichen. Bei vorhandener „Tendenz“ zur Plasmogamie genügt selbstverständlich der bei diesen Versuchen angenommene Kontaktdruck zur Vereinigung. Eine solche Tendenz mag hier vorgelegen haben.

Beim sog. „Pfropfen“ („grafting“) verschmolzen durch Operation gewonnene Tierhälften vollständig innerhalb von 5–20 Minuten. Die Anordnung und Ausdehnung der zusammengefügteten Teile war noch nach 30 Stunden erkennbar (eine Tierhälfte mit Neutralrot gefärbt).

Johnson (1894) gelang bei amerikanischen *Actinosphaerien* keine künstliche Vereinigung, selbst wenn die Zellen sehr dicht beieinander lagen, im Gegensatz zu Howland (1928).

Okada (1930) wundert sich darüber, daß nach den Versuchen von Howland noch nach vier Tagen keine völlige Vermischung des Protoplasma der verschiedenen vereinigten Tiere zu beobachten ist. Jedes der vereinigten Zellen bildet nur einen Teil der neuen Kugel, d. h. der erhaltene Organismus ist „mosaikartig“ aufgebaut.

Okada (1930) drängte zwei *Actinosphaerien* mit zwei gegenüberliegenden Glaskapillaren zusammen und preßte sie fest aneinander. Als erstes Zeichen der Verschmelzung zeigte sich ein „Zerfließen“ des Protoplasma in der Region der Berührung. Dann soll sich körniges Plasma zwischen den beiden Zellen ansammeln. Es trat völlige Verschmelzung der Tiere ein. Bei der Aufnahme von kleineren Teilstücken durch größere soll oft eine Grenzlinie sichtbar sein, die allmählich verschwindet und schließlich völlig unsichtbar wird. Ein kleines, angeschnittenes Tier wird wesentlich rascher total einverleibt als ein intaktes; auch die „Grenz- oder Strukturlinie“ verschwand früher. An Stellen der Vereinigung sind die Axopodien kürzer. „So kann eine vollständige Vereinigung für beträchtliche Zeitdauer erreicht werden, ohne irgendwelche Anzeichen einer Teilung.“ „Teilung“ bedeutet hier Trennung.

Okada konnte an seinem Material feststellen, daß verschmolzene *Actinosphaerien* sogar länger als eine Woche im Zusammenhang blieben. Das Entoplasma des lebenden *Actinosphaerium* scheint immer in Bewegung zu sein.

Einstellung 58 gibt in Abb. 1 a–l einen typisch verlaufenden Zentrifugerversuch. Die Tiere wurden bei 4400 Umdrehungen je Minute 20 Minuten lang der Einwirkung der Zentrifugalkraft ausgesetzt. Nach Beendigung lagen bei sämtlichen Tieren die dunkelbraunen Nahrungsreste alle auf einer Seite. Während des Zentrifugierens kamen mehrere Plasmogamien zustande. Eine „Kette“ von etwa 6 bis 7 *Actinosphaerien*, die sich langsam einkrümmt, wurde aufgenommen.

An Abb. 1, Teilbild a, weisen die zur „Kette“ zusammengefügteten Tiere sehr kurze und dicke Axopodien auf, offenbar eine Folge des Zentrifugierens. Die „Individualgrenzen“ der vereinigten Tiere sind noch deutlich erkennbar; sie zeigen an, daß *Actinosphaerien* von recht verschiedener

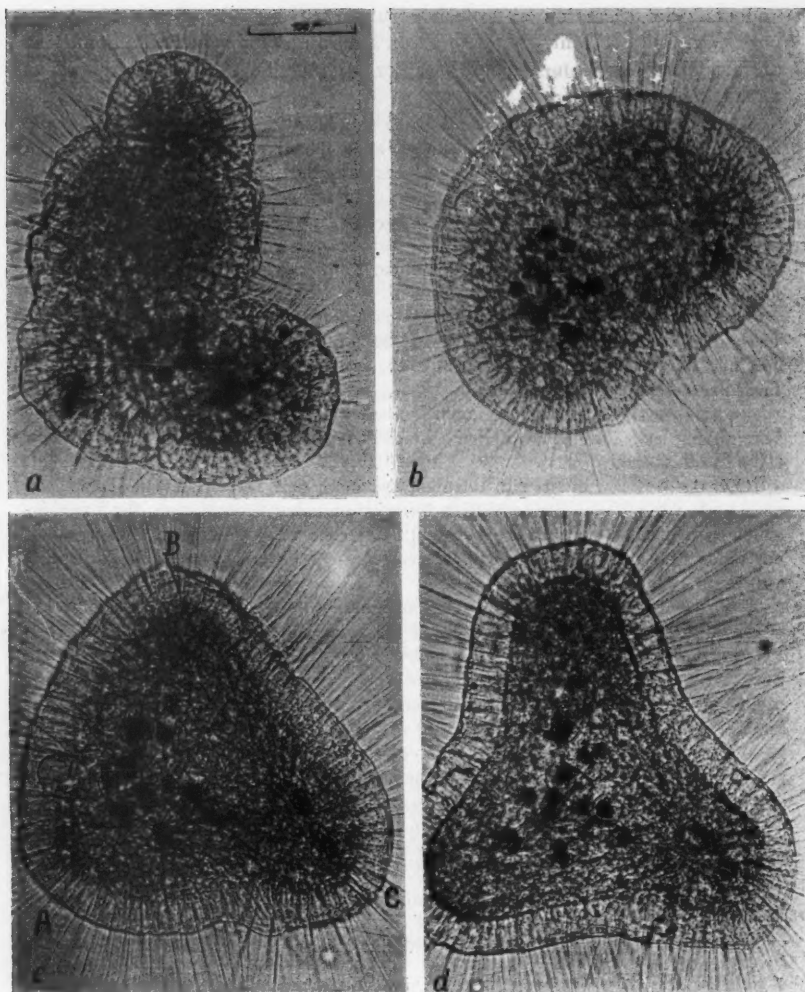
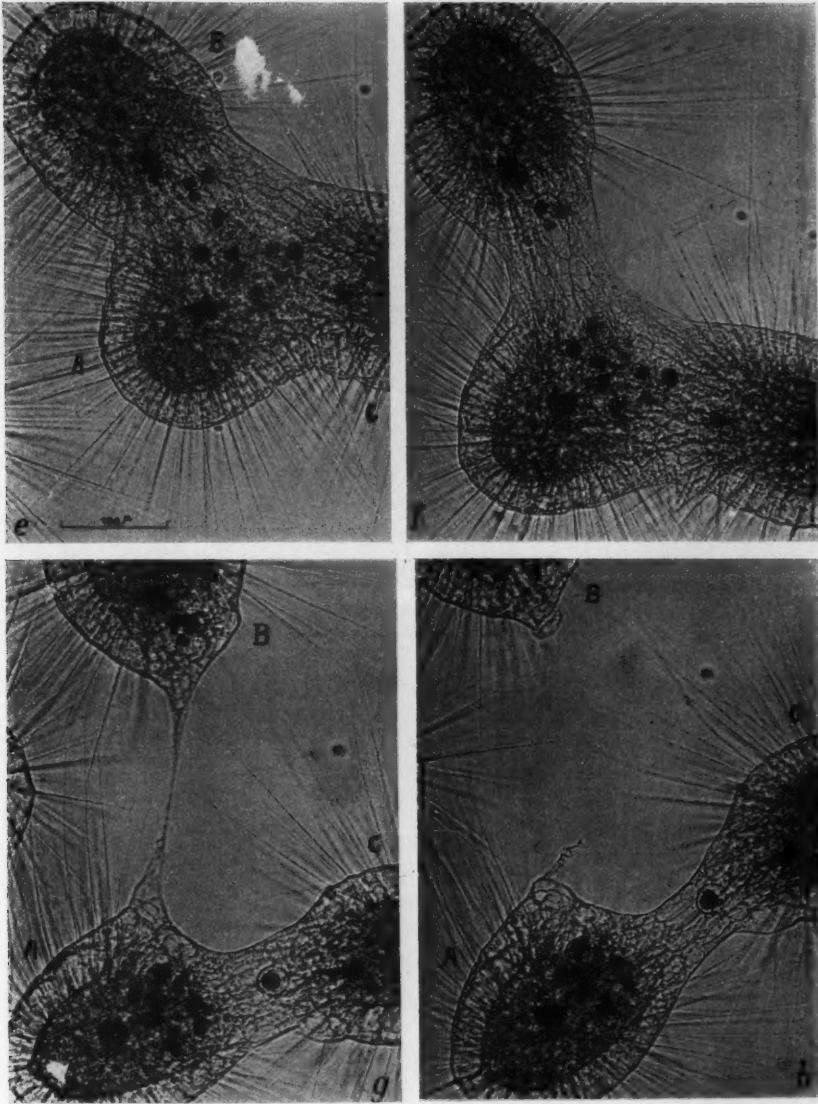
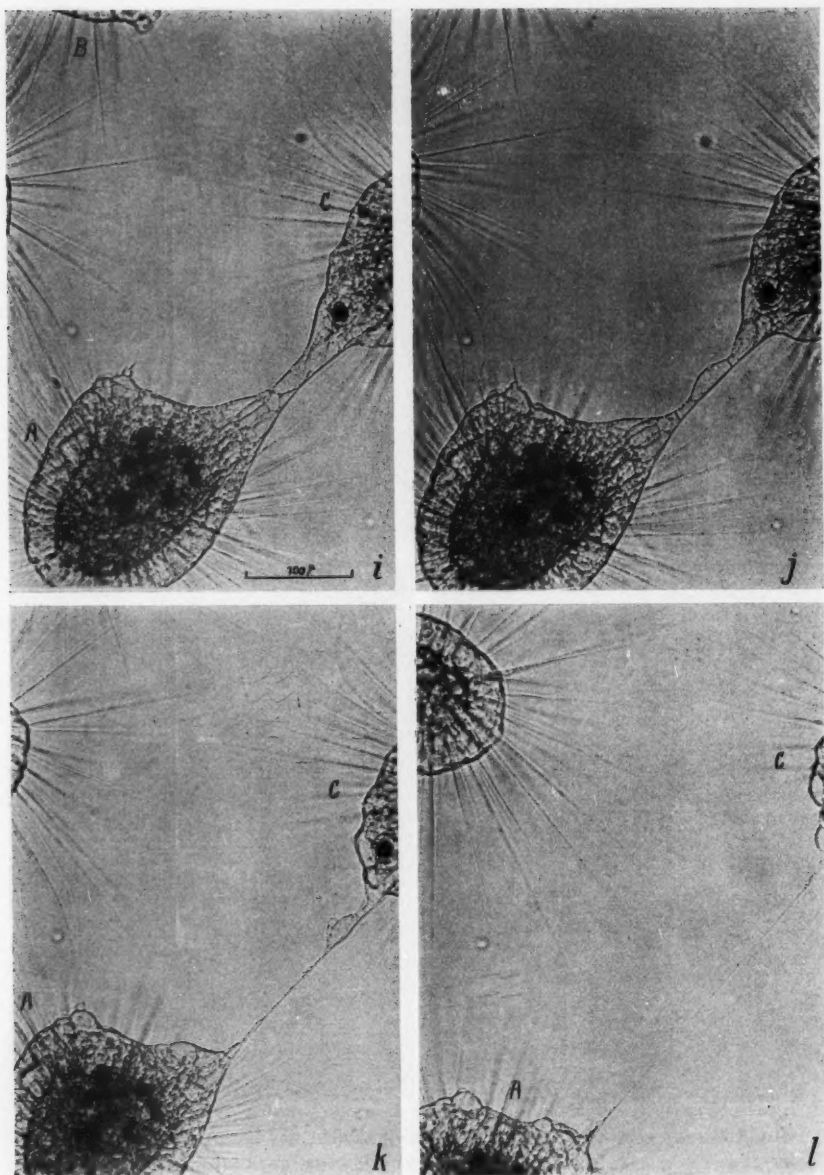


Abb. 1 (Einstellung 58). Durch Zentrifugierung (20^m bei 4400 Umdrehungen je Minute) erhaltenes „Riesenaggregat“ von *Actinosphaerium*. Die „Kette“ besteht aus 6–7 Tieren. *a*: Unmittelbar nach der Zentrifugierung: Einkrümmung des Aggregates. *b*: Abkuglung fast vollendet. *c*: Annahme einer Dreieckform, typisch nach der Zentrifugierung vor Beginn der Trennung. *d*: Beginn des Auseinanderweichens des Riesenaggregates in drei „Zipfel“, unabhängig von den ursprünglichen „Pseudoindividual-Grenzen“. *e*–*h*: Vollständige Trennung der neuentstehenden „Pseudoindividuen“ *A* und *B*; der weniger als 1μ dicke Cytoplasmafaden ist in *h* gerade durchgerissen worden. Die Trennung von



A und *C* erfolgt etwas später. In *e* eingeleitet, steht das Durchreißen des letzten, hier ungewöhnlich dünnen und langen Cytoplasmafadens in Teilbild *h* unmittelbar bevor. Man beachte die „Verdrängung“ des Entoplasma, die Berührung der Ektoplasmaanteile in der Trennungszone, die Umordnung der ektoplasmatischen Alveolen zu einer Reihe und das Ausziehen zum dünnen Plasmafaden. Die



Trennung erfolgt wesentlich schneller als bei nicht zentrifugiertem Material.
Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Größe zur Plasmogamie gekommen sind. Die Entoplasmaanteile stehen bereits untereinander in Verbindung. Eine Zentrifugierungsdauer von 20 Minuten hat ausgereicht, um auch die Ektoplasmaanteile in den Verschmelzungszonen der ehemaligen „Individualgrenzen“ zur Vereinigung zu bringen.

Teilbild *b* (32^m 45^s seit *a*): Die starke Einkrümmung ist beendet; sie hat zu einer Abkugelung geführt unter Ausgleich der durch die ehemaligen „Individualgrenzen“ bedingten welligen Außenkontur. Die Gestalt des Aggregates ist jetzt ein rechts unten abgeflachtes Ellipsoid; die abgeflachte Seite ist die Einkrümmungsseite. Eine Spur der Einkrümmung ist rechts unten noch zu erkennen (Identifizierung mit der gleichen Stelle in Teilbild *a* an der Lage dreier eng zusammenliegender dunkler Nahrungskörper). Der größte Durchmesser des Aggregates mißt 350 μ ; der kleinste Durchmesser 277 μ . Die Höhe des Ektoplasma weist die normale Höhe von 36 μ auf. Die Axopodien haben nahezu ihre normale Länge wieder erreicht.

38^m später zeigt Teilbild *c*, daß das Aggregat die Gestalt eines fast gleichseitigen Dreiecks angenommen hat, das erste Anzeichen der einsetzen- den Trennung in drei „Pseudoeindividuen“. Zwischen *b* und *c* liegt eine Phase völliger Abkugelung. Die Höhen in diesem charakteristischen „Dreieck“ messen: bei *A*: 308 μ , bei *B*: 322 μ , bei *C*: 359 μ .

Die in Teilbild *a*, unten, erkennbaren dunklen Nahrungsreste gehören offenbar zu zwei „Primäreindividuen“; in *b* liegen sie infolge der Einkrümmung etwas dichter zusammen. In *c* sind sie wegen der Umformung des Aggregates zum Dreieck (im optischen Schnitt) zentralwärts verlagert. Da — vorwegnehmend — drei „neue“ Tiere aus dem Aggregat hervorgehen, muß die Gestalt des „Riesentieres“ in *c* eine Scheibe in Dreiecksform sein, mit nahezu überall gleicher Dicke, die etwa dem Durchmesser eines normalen *Actinosphaerium* von etwa 150 bis 170 μ entsprechen dürfte. (Es könnte ja auch ein Tetraeder vorliegen, denn der optische Schnitt allein kann ja nichts Sicheres über die Plastik eines unregelmäßig gestalteten Körpers aussagen, wenn, wie bei den hier angewandten Mikrozeitraffer-Aufnahmen, nicht oder nur möglichst wenig fokussiert werden darf.)

In Teilbild *d* (40^m 15^s seit *c*, 1^b 46^m seit *a*) sind die Nahrungsvakuolen noch mehr zentralwärts verlagert. Die „Seiten“ des „Dreiecks“ sind gleichmäßig leicht eingebuchtet, die Axopodien in der Mitte der Seiten erscheinen entsprechend dem Grade der Einbuchtung gekreuzt infolge ihrer Verankerung zwischen den meist radiär eingestellten ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen. Die leichte Einbuchtung, die die Trennung einleitet, beginnt hier synchron auf den drei Seiten; mit der Einbuchtung geht eine Streckung des Aggregates parallel.

10^m 45^s später wird in Teilbild *e* deutlich, daß *B* mit der Trennung *A* und *C* vorausgehen wird. Es ist noch nicht vorauszusehen, ob *A* und *B* in gleicher Menge „Material“ für den bei der Trennung ausziehenden plasmatischen Verbindungsstrang liefern werden. Die braunen Nahrungsreste gelangen jetzt z. T. in ein Entoplasma, das ursprünglich, vor der Zentrifugierung, einem anderen „Primäreindivuum“ angehörte.

Es ist bereits jetzt darauf hinzuweisen, daß die durch die Trennung entstehenden drei „Sekundäreindividuen“ mindestens aus je zwei „Primäreindi-

viduen“ bestehen hinsichtlich des Zustandes vor der durch die Zentrifugierung offenbar geförderten Vereinigung.

Das Zeitrafferlaufbild beweist eindeutig, daß auch im Entoplasma keinerlei Plasmaströmungen sowohl beim „Ruhetier“ wie auch nach einer Plasmogamie oder vor und während einer Trennung stattfinden.

Bei einer Trennung, wie der vorliegenden, wird also Ekto- und Entoplasma offensichtlich allein nach mechanischen Gegebenheiten auf die „neuen“ Trennungs-Pseudoindividuen hinsichtlich der Menge verteilt. Die Trennung läuft bei derart großen durch Zentrifugieren erhaltenen Aggregaten offenbar wesentlich schneller ab als bei unbeeinflussten Objekten. (Unter Trennung im engeren Sinne wird der Augenblick des Durchreißen des Plasmafadens verstanden.) In Teilbild *e* ist bereits deutlich zu erkennen, daß zuerst eine Trennung von *B* von *A* und *C*, dann von *A* und *C* erfolgen wird.

In Teilbild *f* (5^m seit *e*; 2^h 2^m seit *a*) wird es klar, daß *B* die Hauptmenge des Ektoplasma von *A* erhält, jedoch „zieht“ *B* aber auch in schräger Richtung einen Teil aus der *C*-Region ab. Zwischen *A* und *C* wird gerade das letzte Entoplasma aus der späteren Trennungszone in die entoplasmatischen *A*- und *C*-Räume befördert. Dies geschieht folgendermaßen: infolge des Auseinanderweichens entsteht ein „Ektoplasmarohr“, dessen „Lumen“ von Entoplasma ausgefüllt ist. Allmählich wird das gegenüber dem relativ „festeren“ Ektoplasma offenbar leichter bewegliche Entoplasma nach beiden Seiten verdrängt, bis sich die Innenschichten des „Ektoplasmarohres“ berühren und das „Lumen“ verschwunden ist. Es ist durchaus notwendig, sich diese Vorgänge, trotz der Kleinheit des „Substrates“, an denen sie sich abspielen, körperlich vorzustellen und nicht an der üblichen mikroskopischen Betrachtungsweise im durchfallenden Licht mit der meist erforderlichen Einstellung auf den optischen Schnitt zu kleben. Man beachte in *f* die zwischen *A* und *B* bereits sehr stark gestreckten ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen. Die Trennung von *A* und *B* geht in der typischen Weise weiter, ungestört von der fast gleichzeitig erfolgenden Trennung von *A* und *C*.

In Teilbild *g* (5^m 15^s seit *f*; 2^h 7^m 15^s seit *a*) ist *A* und *B* nur noch durch einen dünnen plasmatischen Faden verbunden, der etwa 4 μ dick ist. Von links nähert sich ein kleines *Actinosphaerium* mit sehr langen Axopodien. Der ektoplasmatische Verbindungsstrang zwischen *A* und *C* hat jetzt die gleiche Phase der Dehnung erreicht wie der zwischen *A* und *B* in Teilbild *f*. In seiner Mitte liegt eine kleine Nahrungsvakuole, die später von *C* aufgenommen wird.

1^m 15^s nach Teilbild *g* reißt der Plasmafaden zwischen *A* und *B*. Teilbild *h* (2^h 8^m 30^s seit *a*) vermittelt einen Eindruck von der Elastizität des Fadens. Der auf *A* zurückgeschnellte Fadenrest ist spiralig gewunden wie etwa der Stiel einer Vorticella. Der Fadenrest hängt an dem in *g* noch spitzkegelförmigen, aus wenigen Flüssigkeitsvakuolen bestehenden proximalen Teil des Verbindungsstranges, der sich allmählich abkugelt und in das Ektoplasma von *A* einbezogen wird. In *B* wird der bereits abgerundete proximale Verbindungsrest gerade abgeflacht und in das grobvakuolisierte Ekto-

plasma eingefügt. Der Abstand von *A* und *B* (222μ) hat sich nach dem Durchreißen des Fadens nur unwesentlich vergrößert. In Teilbild *i* ($2^m 15^s$ seit *h*; $2^h 10^m 45^s$ seit *a*) hat sich *B* auf 327μ von *A* entfernt. Der Verbindungsstrang von *A* nach *C* ist an der schmalsten Stelle noch 18μ breit. Sehr deutlich ist seine Zusammensetzung aus einigen wenigen ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen erkennbar. Bei *A* wird auf dem Rest des Verbindungsstranges ein Axopod gebildet; es ist bereits 11μ lang. Da es genau an der Stelle des Fadenrestes (*h*) liegt, ist es wahrscheinlich direkt aus diesem hervorgegangen, ohne daß der Fadenrest erst völlig einbezogen wurde. Die dünnste Stelle des Verbindungsstranges zwischen *A* und *C* ist in Teilbild *j* ($1^m 15^s$ seit *i*) auf 9μ zurückgegangen; sie besteht nur noch aus zwei ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen. Die längere (48μ lang und 17μ breit) weist rechts einen völlig geraden Kontur auf, dagegen ist sie nach links oben gewölbt. Die kürzere, in der Richtung auf *A* zu gelegene, ist 19μ lang und 9μ breit. Diese beiden distalen, unter Zug stehenden Flüssigkeitsvakuolen gehen jederseits in die proximalen, kegelförmigen, ebenfalls nur noch aus vakuolisiertem Ektoplasma bestehenden „Ansatzstellen“ des Verbindungsstranges über.

Aus der Anordnung dieser unter Zugwirkung gedehnten Ektoplasmaanteile lassen sich Schlüsse ziehen über den hohen Viskositätsgrad der ektoplasmatischen Wände, aus denen sich die relativ sehr großen Flüssigkeitsvakuolen der Rindenschicht von *Actinosphaerium* zusammensetzen, ferner über die mit großer Zähigkeit verbundene Elastizität dieser nur etwa 2μ dicken Plasmawände. Der Zustand der Verbindungsbrücke in *j* ist hierfür besonders günstig, weil in dem am stärksten gedehnten mittleren, dünnsten Teil gerade nur eine Reihe von Flüssigkeitsvakuolen vorliegt. Hier interessiert vor allem die Gestalt der langen, mittleren Alveole, die sehr deutlich die Wirkung des Zuges zeigt: der rechte Kontur stellt eine gerade Linie dar, der linke ist gewölbt.

Es wurde bereits auf die erstaunlich große Widerstandsfähigkeit der ektoplasmatischen grobvakuolisierten Cytoplasmastruktur hingewiesen; die Zentrifugierung hat keinen „Einsturz“ der Alveolenwände herbeigeführt, nicht einmal ihre Anordnung wesentlich beeinflusst oder gestört. Aus den w. u. behandelten Pressungsversuchen wird diese bemerkenswerte mechanische „Strukturfestigkeit“ noch deutlicher hervorgehen.

Bei der Trennung eines „Pseudoindividuum“ von *Actinosphaerium* in zwei neue „Pseudoindividuen“, nachdem das Entoplasma des Verbindungsstranges nach beiden Seiten infolge allmählicher Einengung des „Ektoplasmarohres“ zwischen den sich trennenden „Tieren“ zurückgedrängt worden ist, werden die großen Flüssigkeitsvakuolen des jetzt nur noch aus Ektoplasma bestehenden soliden Verbindungsstranges gemäß den in ihm auftretenden Zugwirkungen verschoben. Daß die von einer nur wenige Mikron dicken Cytoplasmaschicht umgrenzten Alveolen leicht — unter Formveränderungen — aneinander vorbeigleiten können, da ihre plasmatischen Wände ja ihrer Entstehung nach Duplikaturen darstellen, wurde früher schon bei der Analyse der Ausstoßung einer Nahrungsvakuole erwähnt (W. Kuhl 1951, Einstellung 46, Abb. 22, a—l).

In Teilbild *k* ($1^m 15^s$ seit *j*; $2^h 13^m 15^s$ seit *a*) ist der Abstand von *A* und *C* von 175μ in *j* auf 252μ vergrößert worden. Ein Vergleich mit *j* zeigt, daß der eigentliche, letzte dünne Verbindungsfaden von den gerade gestreckten Plasmaanteilen der rechten Seite des Verbindungsstranges von *j* gebildet worden ist! Die mittlere, 48μ lange Alveole auf

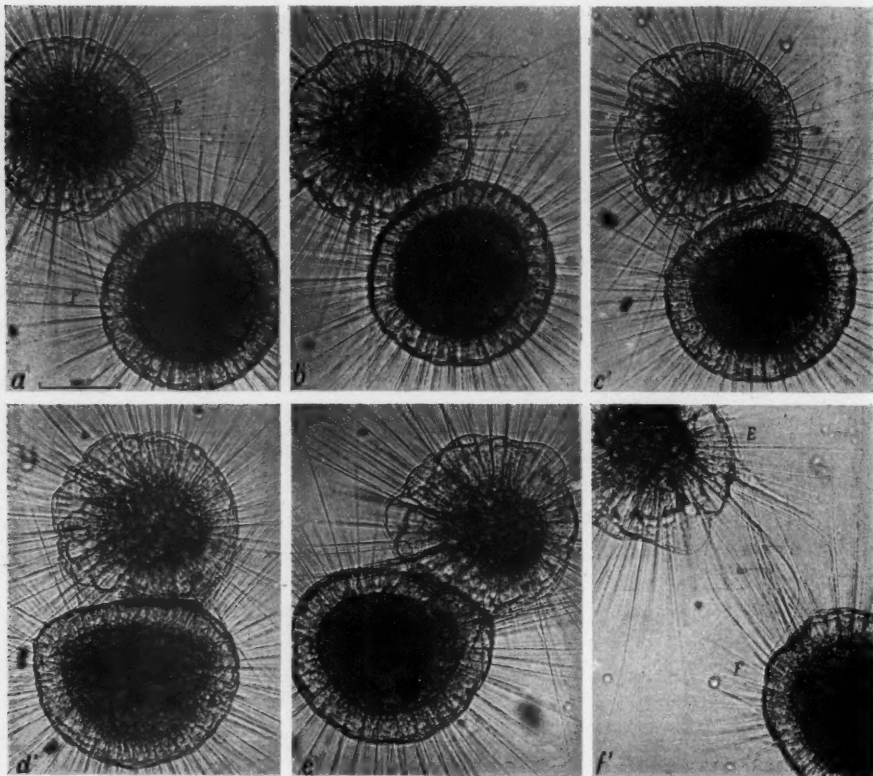


Abb. 2 (Einstellung 58). Zwei mittelgroße Aggregate aus dem gleichen Material wie Abb. 1; 16 Stunden nach der Zentrifugierung. $1\frac{1}{2}$ stündige enge Berührung ohne Ausbildung einer temporären Plasmabrücke! Keine Plasmogamie, sondern Trennung unter Merkmalen einer deutlichen Phobie: *f'* zeigt florettähnlich gebogene, z. T. noch verklebte Axopodien. Teilstrich = $0,1 \text{ mm}$. Zeitangaben im Text.

der Phase *j* ist von der kürzeren, 19μ messenden getrennt worden; die größere ist auf 37μ zusammengezogen und in die Nähe von *C* befördert worden. Sie verschmilzt $2,5^m$ später mit der kleinen Fadenbasis von *C*. Der Rest der kürzeren Alveole der Phase *j* ist wohl in der 26μ langen und 4μ

breiten Verdickung des Fadens in der Nähe der Strangbasis von *A* zu sehen.

Die erstaunliche Zähigkeit des Ektoplasma bzw. des aus den Wänden einiger Flüssigkeitsvakuolen hervorgegangenen, bei der Trennung auseinandergezogenen Plasmamaterials geht aus Teilbild *l* (1^m 15^s seit *k*; 2^b 17^m seit *a*) hervor. Der *A* und *C* noch verbindende Cytoplasmafaden hat eine Länge von 379 μ ; er steht unmittelbar vor dem Zerreißen und mißt an der dünnsten Stelle weniger als 1 μ !

Aus der Kontrollaufnahme der Einstellung 58, 14 Stunden seit Teilbild *l*, wurde das Verhalten zweier in ihrem Habitus recht verschiedener Tiere in den Teilbildern *a'*–*f'* der Abb. 2 dargestellt.

a' läßt eine typische Annäherung ohne Störung der Stellung der Axopodien von *E* und *F* in der Näherungszone erkennen; Tierabstand: 45 μ . Beide Tiere zeigen eine leichte Abflachung im Bezirke größter Nähe. *F* erscheint im Habitus trotz der etwa 16 Stunden vorher erfolgten Zentrifugierung durchaus normal (größter Durchmesser 235 μ , kleinster Durchmesser 214 μ). Das 46 μ hohe Ektoplasma von *E* ist auffällig stark vakuolisiert; einzelne Alveolen ragen nahezu halbkugelig über die Oberfläche vor. Die Grenze Ekto-Entoplasma ist unscharf; die Axopodien von *E* sind normal ausgebildet, ihre Verankerung im Entoplasma ist sehr deutlich.

7^m 24^s später (Teilbild *b'*) berühren sich *E* und *F* eng, und zwar in einer Breite von 98 μ . Die Abflachung von *F* hat zugenommen. Beide „Partner“ lassen infolge ihres Verhaltens die Vermutung zu, daß, trotz der abweichenden Phase von *E*, eine Plasmogamie oder eine temporäre „Brückenbildung“ zustande kommen kann. Die „Partner“ verharren sehr lange in dieser Phase, was aus Teilbild *c'* (17^m 18^s seit *b'*!) hervorgeht. In *E* ist auf der linken Seite die typische Ektoplasmastruktur derart „gestört“, daß einzelne Flüssigkeitsvakuolen tief in das Entoplasma hineinragen. Eine solche Riesenalveole hat eine Länge von 60 μ (!) bei einer größten Breite von 32 μ ; die Gestalt ist ausgeprägt keilförmig. Der größte Durchmesser von *F* mißt jetzt 243 μ , der kleinste 205 μ . Die Berührungszone ist jetzt auf dem optischen Schnitt 104 μ breit; ihre Konfiguration ist noch immer derart, daß eine „Brückenbildung“ eintreten könnte (über „temporäre Brückenbildungen“ s. W. Kuhl 1953, Einstellungen 45 und 50, Abb. 11, 12, 13). Im Zeitrafferlaufbild ist das aus verschmolzenen Axopodien gebildete „Verbindungsplasma“ auch hier in lebhafter Bewegung.

Teilbild *d'* zeigt die Lage von *E* und *F* nach weiteren 28^m und 14^s (52^m 58^s seit *a'*). *E* weist auf der linken Seite immer noch eine wesentlich stärker gestörte Anordnung und Größe der Flüssigkeitsvakuolen des Ektoplasma auf als auf der rechten; gegenüber *c'* sind einige Lageveränderungen eingetreten, wahrscheinlich durch eine kleine Drehung von *E* hervorgerufen. *F* ist wesentlich stärker abgeplattet; sein größter Durchmesser ist jetzt 257 μ , sein kleinster 196 μ . *E* befindet sich nicht in der Mitte der 191 μ breiten flachen Zone von *F*, sondern zeigt eine Verlagerung nach rechts: *E* gleitet entlang der Abflachung von *F* nach rechts. Es besteht zu diesem Zeitpunkt kein Zweifel mehr, daß zwischen *E* und *F* weder eine temporäre Brückenbildung noch eine Plasmogamie zustande kommen wird.

Bemerkenswert ist nun das ungemein langsame Fortschreiten des Trennungsvorganges. Teilbild e' wurde $42^m 56^s$ später als d' aufgenommen ($1^h 35^m 54^s$ sind seit a' vergangen), und noch immer besteht eine, wenn auch eigenartige Verbindung zwischen E und F . E liegt jetzt beinahe an der rechten äußeren Kante der Abflachung von F . In E besteht jetzt fast das ganze Ektoplasma aus Riesen-Flüssigkeitsalveolen; nur rechts unten herrscht noch eine normale Struktur der Rindenschicht. Die Abflachung von F hat etwas abgenommen. Man beachte die Stellung der Axopodien von E , die (links) über die freie Stelle der Abflachung (wie „Kontaktfedern“) hinweggleiten. Die Elastizität der Axopodien kommt hier durch ihre leicht gebogene Gestalt klar zum Ausdruck. Rechts werden in dem Winkel, den beide Tiere miteinander an der Grenze der Berührung bilden, etwa sechs bis acht Axopodien von F zu einem Bündel, in dem sie parallel liegen, zusammengedrängt. $7^m 26^s$ später (Teilbild f' , $1^h 43^m 22^s$ seit a') ist die Trennung von E und F erfolgt; die Tiere sind bereits 158μ voneinander entfernt. Infolge der Eigenbewegung der beiden ehemaligen „Partner“ ist ihre Lage nach der Trennung jetzt eine andere geworden: E liegt links oben von F .

Besonders charakteristisch ist das Verhalten der Axopodien zwischen E und F . Der Ausdruck der jetzt bestehenden „Phobie“ zwischen den beiden *Actinosphaerien* kann kaum deutlicher in Erscheinung treten: beiderseits Gruppen von stark gebogenen und z. T. „verhedderten“ langen Axopodien, die über die Oberfläche von E und F gleiten oder streifen. Bei E liegt offenbar die ehemalige Berührungszone jetzt an der rechten Seite, bei F links oben. Ein eigenartiges „Bündel“ fast parallel liegender Axopodien erstreckt sich von F nach der rechten Seite von E und berührt dessen Oberfläche an der Basis eines besonders breiten Axopods, das vielleicht aus mehreren Axopodien verklebt oder verschmolzen ist. Möglich ist auch folgendes: Ohne Zweifel bestand zu Anfang der Annäherung und Berührung eine „Stimmung“ zur Bildung einer temporären Plasmabrücke zwischen E und F oder vielleicht sogar zu einer Plasmogamie, trotz der offensichtlich so verschiedenen „Phasen“, in denen sich beide Tiere befinden (kenntlich an der Ektoplasmastruktur, an der relativ großen Höhe des Ektoplasma und an der unscharfen Grenze zwischen Ekto- und Entoplasma). Diese Phasenverschiedenheit (in ihrer funktionellen Bedeutung noch keineswegs klar erkannt) ist dann schließlich die Ursache, daß doch weder eine temporäre Plasmaverbindung noch eine Plasmogamie zustande kommt. Das merkwürdige, aus einigen Axopodien bestehende „Parallelbündel“ besteht wahrscheinlich aus den Axopodien, die während der engen Berührung von E und F — wie es meist der Fall ist — „eingeschmolzen“ wurden und sich im Zeitrafferlaufbild als eine sehr bewegliche und stark metabole Plasmamasse erwiesen. Bei der Trennung von E und F wurde diese sehr dünnflüssige und form-labile Plasmamasse zwischen den sich langsam voneinander entfernenden „Partnern“ faden- oder strangartig ausgezogen. Die zu E tangential Lage des Axopodienbündels wird durch die Drehung der Partner bei der Trennung verständlich. Es sei noch darauf hingewiesen, daß F nach der Trennung wieder die normale Kugelgestalt angenommen hat.

Zusammenfassung über die Einstellung 58 (Abb. 1 und 2)

Durch 20^m dauerndes Zentrifugieren bei 4400 Umdrehungen je Minute wird die Kugelgestalt der Tiere nicht beeinflusst; die Nahrungsvakuolen werden zentrifugal auf eine Seite verlagert. Die grobvakuolisierte Ektoplasmastruktur wird nicht zerstört und nicht merklich verändert.

Die infolge der Zentrifugalkraft aneinander gedrückten Tiere kommen durch den engeren Kontakt leichter zur Plasmogamie. Eine „Kette“ von etwa sechs bis sieben Tieren wurde unter Zeitraffung gefilmt. Das zunächst kurze Axopodien aufweisende große, zur Aufnahme ausgewählte Aggregat krümmt sich wie ein künstlich isolierter Gewebefetzen unter „cytolisthetischen“ Erscheinungsformen (W. Roux) ein und wird zur Kugel, vielleicht auch zu einer etwas abgeplatteten Kugel, die sich im Laufe einer halben Stunde stärker abplattet und Dreiecksform annimmt. Das Aggregat trennt sich aktiv in drei neue „Pseudoindividuen“, und zwar völlig unabhängig von den ursprünglichen Grenzen der die „Kette“ zusammensetzenden „Primärindividuen“. Die Trennung verläuft nicht synchron; es werden sehr lange (379 μ l) und sehr dünne (weniger als 1 μ) Cytoplasmafäden ausgezogen, die nach dem Zerreißen spiralig „zurückschnurren“. Die Trennung in drei kleinere Aggregate erfolgt offenbar schneller als bei nicht zentrifugiertem Material.

16^h nach der Zentrifugierung kommen zwei mittelgroße Aggregate in Berührung (Kontrollaufnahme) und bleiben 1^h 30^m in innigem Kontakt, ohne daß eine temporäre Plasmabrücke oder eine Plasmogamie zustande kommt. Der eine „Partner“ weist offenbar Rückbildungs- (Encystierungs-) Merkmale auf. Die Trennung erfolgt unter Anzeichen einer deutlichen „Phobie“.

Bemerkenswert ist der Wechsel im Verhalten, der erst nach andert-halbstündigem engem Kontakt erkennbar wird und dann sehr plötzlich zur Trennung führt. Wer der aktive Partner ist, läßt sich schwer entscheiden (ohne Kontrolle durch das Zeitrafferlaufbild), desgleichen, inwiefern etwa die 16^h vorher erfolgte Zentrifugierung einen Einfluß auf das merkwürdige Verhalten ausgeübt hat.

Ein etwas anderes cytodynamisches Verhalten zeigt die Einstellung 62 (Abb. 3, 4). Aus dem Zuchtaquarium wurden 20 *Actinosphaerien* entnommen und 30 Minuten bei 4400 Umdrehungen je Minute zentrifugiert. Es lagen nachher acht Aggregate vor, deren größtes unter Zeitraffung aufgenommen wurde; außer den Aggregaten fanden sich auch noch einige einzeln gebliebene Tiere vor. Mehrere Aggregate wiesen eine langgestreckte Gestalt auf. Infolge der Zentrifugierung kamen Tiere zur Vereinigung, die sehr verschiedene Größe und verschieden hohes Ektoplasma zeigten.

Abb. 3, a läßt die Gestalt des Riesenaggregates unmittelbar nach der Zentrifugierung erkennen. Größte Länge: 567 μ , größte Breite: 283 μ . Der wahrscheinlich aus drei *Actinosphaerien* bestehende „Fortsatz“ ist 257 μ lang und 149 μ breit. Die Ansatzstelle ist nur 102 μ breit. Manche ehemalige Grenzen der „Primär-Individuen“ sind im Aggregat noch mehrere Stunden deutlich an der verschiedenen dichten Struktur des Ento-

plasma zu erkennen. Die Axopodien des in der Gesamtheit keulenförmigen großen Aggregates sind infolge der Zentrifugierung eingezogen und daher an ihrer Basis verbreitert. Es liegt gerade die Phase des Beginns des Wieder-

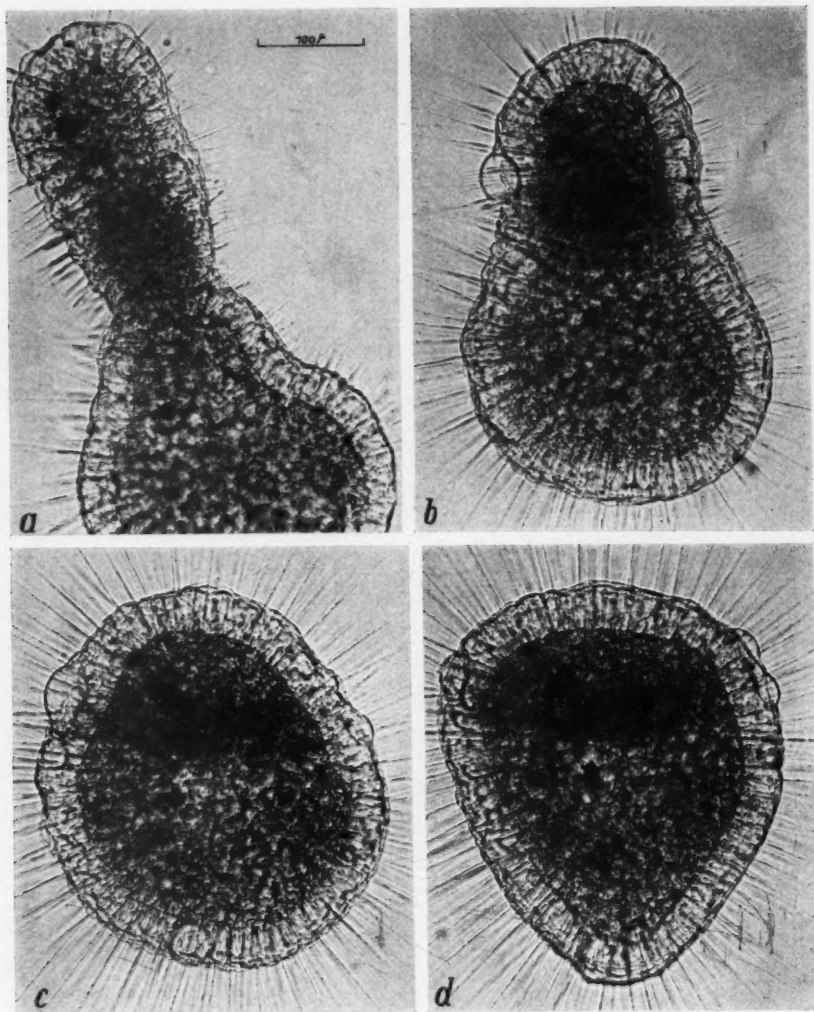
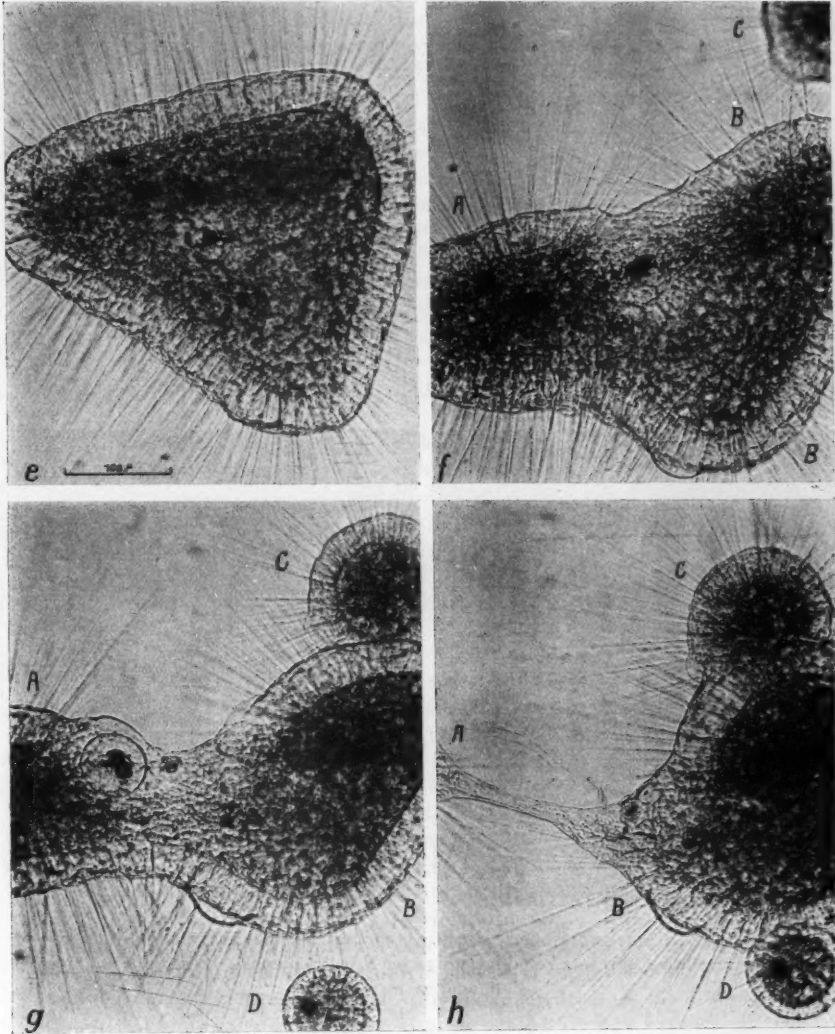


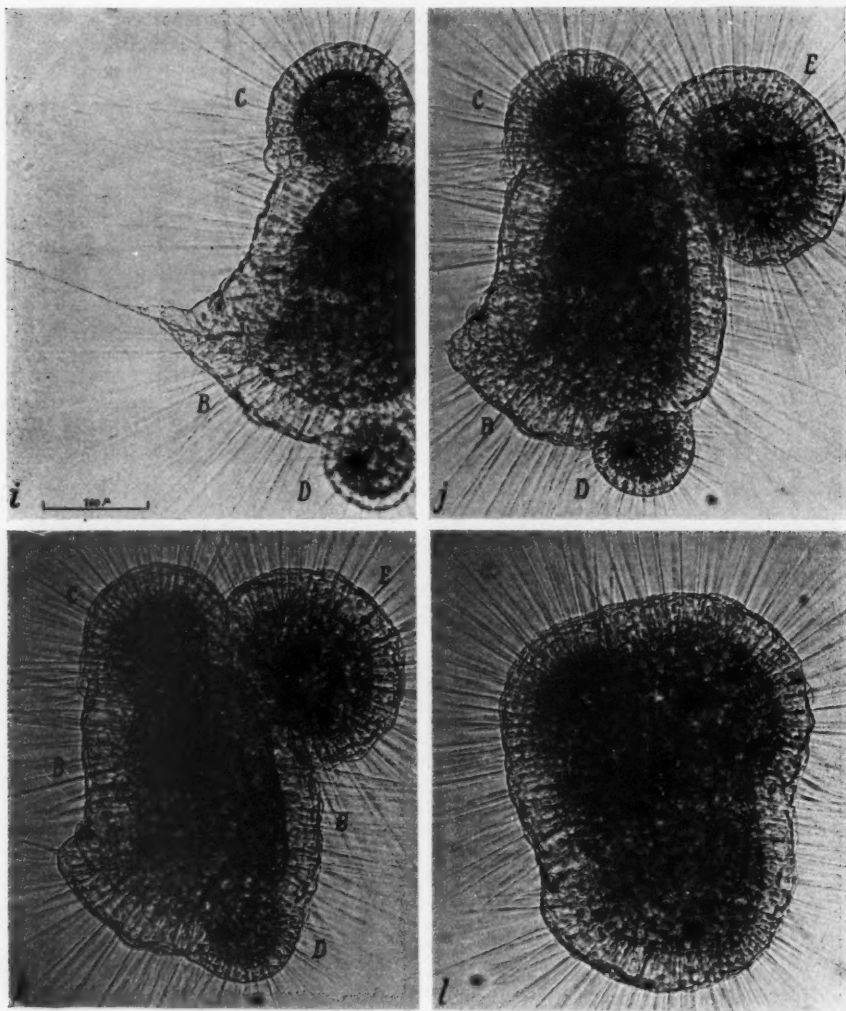
Abb. 5 (Einstellung 62). Verhalten eines durch halbstündiges Zentrifugieren bei 4400 Umdrehungen je Minute erhaltenen Riesenaggregates. a: Unmittelbar nach der Zentrifugierung. „Kette“ mehrerer Tiere an großem Aggregat; sie wird nicht umgeklappt, sondern unter Verbreiterung eingezogen (b). c: Riesenaggregat abge-

ausstreckens vor. Schätzungsweise setzt sich das Riesenaggregat aus sechs bis acht Einzeltieren zusammen; die Höhe des Ektoplasma beträgt im kugeligen Anteil 34μ .



kugelt; dunkle Entoplasmazone der „Kette“ noch sichtbar. d: Annahme der Dreiecksform. e: Beginn der Trennung. f—i: Trennung in A und B beendet. C und D verschmelzen mit B und verhindern eine weitere Trennung von B. j: Drittes *Actinosphaerium* E plasmogamiert mit B! l: Das durch die Plasmogamie

Protoplasma, Bd. XLIII/1—2.



mit C, D und E stark vergrößerte, an der Trennung verhinderte, beinahe schon abgekugelte große Aggregat. Verschmelzung von E fast vollendet. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Wie Abb. 3, b (22^m 10^s seit a) zeigt, ist der „Stiel“ nicht eingekrümmt worden, sondern er hat sich in sich verkürzt und dadurch stark verbreitert. Die Gesamtlänge des Aggregates beträgt jetzt 425 μ , es ist also bereits eine Verkürzung um 144 μ eingetreten. Links in der Mitte des Fort-

satzes steht eine kontraktile Vakuole kurz vor der Entleerung: die infolge der Zentrifugierung offensichtlich erleichterte Plasmogamie behindert also keineswegs die Funktion von ektoplasmatischen Organellen der in Verschmelzung begriffenen „Primärindividuen“, sofern diese nicht gerade in der Berührungs- und „Umschmelzungs-Zone“ des Ektoplasma liegen. Aus den dicken basalen Teilen der eingezogenen Axopodien gehen jetzt die neuen, noch sehr dünnen Axopodien hervor.

Über eine Phase, in der der „Stiel“ nur noch wie eine abgerundete Kaulotte dem kugeligen Anteil des Aggregates aufsitzt, wird die völlige Abkuglung des Riesenaggregates erreicht; 51^m 34^s seit Teilbild *a* wird das in *c* (29^m 20^s seit *b*) abgebildete Stadium erreicht mit einer größten Breite von 527 μ und einer Ausdehnung in Richtung der vorausgegangenen Kontraktion von 355 μ . Die dunkle entoplasmatische Zone im oberen Drittel der Riesenkugel stammt von einem „Primärindividuum“; sie ist bereits in *a* und *b* in der Stielbasis zu sehen. Infolge der Plasmogamie und der Einbeziehung des „Stieles“ in den kugeligen Anteil des Aggregates und der damit verbundenen Verbreiterung ist das ursprünglich kugelige dichte Entoplasma dieses „Zwangspartners“ stark in die Breite gezogen. Die kontraktile Vakuole des ehemaligen „Stiels“ arbeitet trotz der Abkuglung ungestört weiter.

Neun Minuten später beginnt auch in diesem Falle wieder die Umformung zur charakteristischen Dreiecksgestalt (vgl. Abb. 1, *c* und *d*), die erste Andeutung beginnender Aufteilung des Riesenaggregates (= „Sekundär-Pseudoidividuum“) in „tertiäre „Pseudoidividuen“.

Die Teilbilder *d* (29^m 24^s seit *c*) und *e* (19^m 22^s seit *d*) zeigen die Umgestaltung des Aggregates; die dunkle Zone erleichtert die Orientierung, in *e* ist sie noch weiter ausgezogen. In Teilbild *d* (1^h 21^m seit *a*) liegt die größte Ausdehnung von 369 μ noch in der Richtung der vorausgegangenen Einbeziehung des „Stieles“; der am stärksten abgerundete Teil des Aggregates (in *c* unten) ist jetzt infolge aktiver Bewegungen des Aggregates der spitzeste geworden. In *e* wird eine neue innere Umformung deutlich: In nahezu 20^m ist eine Verbreiterung in einer Richtung eingetreten, die senkrecht zu der größten Ausdehnung in *d* steht; das Zeitrafferlaufbild sowie die Lage der dunklen entoplasmatischen Zone und der tiefdunklen Nahrungsteilchen lassen keinen Zweifel darüber, daß tatsächlich eine innere Verformung eingetreten ist. Der neue größte Durchmesser liegt jetzt in der Richtung der dunklen Entoplasmazone; er mißt 387 μ . Das Auseinanderweichen des Riesenaggregates findet, wie aus Teilbild *f* (27^m 36^s seit *e*; 2^h 7^m 24^s seit *a*) hervorgeht, vorwiegend in dieser Richtung statt: das „Pseudoidividuum“ *A* trennt sich vom Aggregat; hierdurch wird die dunkle Zone — die Entoplasmaregion eines früheren „Primär-Pseudoidividuum“ vor der Zentrifugierung — in der Mitte durchgeteilt. Auch die Trennung dieses Riesenaggregates geht also wieder ohne Rücksicht auf die ehemaligen „Grenzen“ der primären „Pseudoidividuen“ im „sekundären“ Riesenaggregat vonstatten. Es hat zunächst den Anschein, als ob die Restmasse des Aggregates *B* sich ebenfalls noch in zwei tertiäre „Pseudoidividuen“ auflösen würde, ähnlich wie in der Einstel-

lung 58, Abb. 1, *f-l*. In beiden Fällen wurde zentrifugiert, und das gefilmte Aggregat nimmt nach erfolgter Abkuglung die typische Dreiecksgestalt an, die nur verständlich ist als erste Andeutung einer Trennung in drei tertiäre „Pseudoeindividuen“.

Oben rechts nähert sich ein *Actinosphaerium C* von 136μ Durchmesser. Der Aggregatrest *B* hat eine größte Längsausdehnung von 355μ . In der Trennungszone von *A* und *B* wird (oben) eine größere Nahrungsvakuole sichtbar, die in *d* in der Mitte des dreieckigen Aggregates dicht unter der dunklen Zone bereits schwach zu erkennen ist.

Aus dem Zeitrafferlaufbild geht auch in diesem Falle einwandfrei hervor, daß während und nach der Plasmogamie sowie vor, während und nach der Trennung im Entoplasma keinerlei Strömungen auftreten, die eine mehr oder weniger starke Durchmischung der zusammengefügtten Cytoplasmamassen hätte bewirken können.

Abb. 5, Teilbild *g* ($15^m 32^s$ seit *f*) zeigt, daß die oben erwähnte, nunmehr fast nur noch von Ektoplasma umgebene große kugelige Nahrungsvakuole von *A* übernommen wird. Einige ektoplasmatistische Flüssigkeitsvakuolen werden durch diese Vakuole nach außen vorgewölbt, wodurch der glatte Kontur in der Zugregion gestört ist. Diese Tatsache bestätigt wiederum die sehr große Widerstandsfähigkeit der ektoplasmatistischen Flüssigkeitsvakuolen.

Während *C* in der einleitenden Phase der Plasmogamie mit *B* steht, nähert sich *B* unten ein nur 88μ im Durchmesser aufweisendes kleines *Actinosphaerium, D*. An der Kreuzungsstelle der Axopodien von *D* und *B* bemerkt man kleine „Knoten“, die ersten Anzeichen der beginnenden Verschmelzung der Axopodien zum „Kittplasma“. (Vgl. W. Kuhl 1951, Einstellung 48, Abb. 6, *e*, wo trotz dieser „Knoten“ keine Plasmogamie zustande kommt.)

In Teilbild *h* ($8^m 26^s$ seit *g*) ist der Verbindungsstrang zwischen *A* und *B* auf 15μ verjüngt; er besteht nur noch aus einer Reihe von Flüssigkeitsvakuolen. Die Plasmogamien von *C* und *D* mit *B* schreiten in normaler Weise fort. Die Maße von *D* sind jetzt: Durchmesser = 86μ ; Höhe des Ektoplasma: 11μ .

$1^m 52^s$ später (*i*) beträgt die Dicke des Plasmafadens zwischen *A* und *B* an der dünnsten Stelle noch 2μ . Die letzten Reste des Ektoplasma des Verbindungsfadens gleiten gerade an ihm in das Ektoplasma von *B* zurück. Zwischen *B* und *C* wird die Entoplasmaverbindung hergestellt.

Teilbild *j* ($5^m 24^s$ seit *i*) läßt deutlich erkennen, daß *B* seit *h* seine Gestalt nicht wesentlich verändert hat. *B* wird ja nun auch von drei (*E* ist noch hinzugekommen!) verschieden großen *Actinosphaerien* förmlich belagert, die sämtlich eine Plasmogamie eingehen.

Der plasmatische Verbindungsfaden zwischen *A* und *B* besteht immer noch; in seinem kegelförmigen Basalteil der Trennungsregion befindet sich das Ektoplasma in Umbildung zur stationären, grobvakuolisierten Struktur. *C, D* und *E* unterscheiden sich in der Phase der Verschmelzung mit *B* entsprechend dem zeitlichen Nacheinander ihrer ersten Berührung mit *B*. *D* zeigt gerade einen lobosen entoplasmatischen Fortsatz, der bis in die

Mitte des Ektoplasma von *B* reicht. *E* weist eine breite Eindellung auf, die die starke Krümmung von *B* in der Kontaktregion umgreift. *E* berührt auch das Ektoplasma von *C* im Grunde der „Vereinigungsfurche“. An dieser Stelle ist eine besonders verwickelte Lage für den Vorgang der temporären „Einschmelzung“ und späteren Neubildung der grobvakuolisierten Ektoplasmastrukturen gegeben. In *k*, (8^m 10^s später) tritt dies im Bilde oben deutlich in Erscheinung: Das Ektoplasma von *E* „verschmilzt“ oben mit dem von *B* und *C*, in der Mitte und rechts unten mit dem von *B*. *B*, *C* und *D* sind in Teilbild *k* (2^h 44^m seit *a*) bereits nahezu zu einem einheitlichen „tertiären Pseudoeindividuum“ geworden. *E* hat eine breite entoplasmatische Verbindung mit *B* hergestellt. Der Plasmafaden zwischen *A* und *B* steht unmittelbar vor dem Durchreißen.

5^h 41^m 42^s seit *a* (20^m 48^s seit *k*) zeigt Teilbild *l* der Abb. 3 ein gut abgekugelteres Aggregat; *E* ist noch als halbkugelige Vorwölbung deutlich abgesetzt. Der größte Durchmesser des um ein „Pseudoeindividuum“ (*A*) verringerten und um drei Einzeltiere durch Plasmogamie vergrößerten Aggregates beträgt 563 μ , der kleinste Durchmesser 238 μ . Rechts unten erkennt man noch das niedrige Ektoplasma von *E*, das sich trotz seiner geringeren Höhe mit der wesentlich dickeren Rindenschicht seiner Umgebung vereinigt hat.

Zusammenfassung über die Einstellung 62 (Abb. 3, a—l)

Halbstündiges Zentrifugieren bei 4400 Umdrehungen je Minute hat auch hier das Zustandekommen von Plasmogamien und die Entstehung von Riesenaggregaten erleichtert, ohne daß es zu schädigenden Einflüssen auf die Zellstrukturen infolge der Einwirkung der Zentrifugalkraft gekommen ist. Die Axopodien werden bis auf etwa 25 μ Länge eingezogen, jedoch sofort nach dem Aufhören der Zentrifugierung wieder langsam ausgestreckt. Manche Tiere weisen eine leicht abgeplattete, scheibenförmige Gestalt auf.

Die Plasmogamievorgänge gehen während des Zentrifugierens ungestört vonstatten, desgleichen die auf die Verschmelzung folgende Abkuglung (an anderen Aggregaten als dem in Abb. 3 dargestellten beobachtet).

Nach dem Zentrifugieren finden sich neben Riesenaggregaten auch solche mittlerer Größe und kleine, offenbar nicht verschmolzene „Einzeltiere“. Das zentrifugierte Material weist verschiedene Phasen von Plasmogamien auf; recht labile Zusammenfügungen von verschieden großen „Pseudoeindividuen“ liegen neben solchen Tieren, die offenbar bereits zu Beginn des Zentrifugierens eine Plasmogamie vollständig durchgeführt haben. Die zunächst noch nicht analysierbare „Stimmung“ zur Durchführung von Verschmelzungen wird auch im Zentrifugierungsversuch eine Rolle spielen. Es kommen mehr oder weniger gerade oder gekrümmte „Ketten“ von *Actinosphaerien* verschiedener Größe — und damit verschiedener, unbekannter „Vorgeschichte“ — vor, die sich auch unter Einwirkung der Zentrifugalkraft weiter einkrümmen können und diese „cytolytische“ Bewegung, die zur Kugelgestalt führt, auch nach Aufhören der Einwirkung der Zentrifugalkraft *in vitro* zu beenden vermögen. Zeigt das Entoplasma der in Plasmogamie befindlichen *Actinosphaerien* eine verschieden dichte

Granulastruktur und eine damit verbundene unterschiedliche Durchsichtigkeit im Vergleich zu den benachbarten „Partnern“, so bleiben trotz der Zentrifugierung die ursprünglichen „Pseudoindividualgrenzen“ infolge dieser Unterschiede noch lange im Präparat sichtbar, wenn auch nicht scharf, so doch regional umrissen.

Das aus diesem Material zur Zeitrafferfilm-Aufnahme ausgewählte, aus einer geraden „Zellkette“ und einer „Zellkugel“ bestehende Aggregat 62 (Abb. 5, a—l) hat offenbar während der Zentrifugierung mehrere *Actinosphaerien* normaler Größe in der „Zellkugel“ vereinigt und die Abkuglung fast völlig durchgeführt. Die der großen Kugel aufsitzende Kallotte, an der die geradegestreckte „Zellkette“ die Plasmogamie einleitet und gerade auf der Phase der Entoplasmavereinigung steht, stellt den Rest des zuletzt mit der „Zellkugel“ vereinigten Tieres dar.

Bemerkenswert ist in diesem Falle, daß die „Zellkette“, trotz der Labilität ihrer Lage, nicht umknickt oder sich einkrümmt, sondern mit dem kugeligen, größten Anteil des Aggregates langsam „zusammensackt“. Hier findet demnach kein „Zellengleiten“ (= Cytolisthesis, W. Roux) wie bei der Einstellung 58 (Abb. 1, a, b) statt. In knapp 1 Stunde ist die Abkuglung des gesamten großen Aggregates beendet.

Auch dieses große Aggregat, das unter künstlicher „Nachhilfe“ durch Anwendung der Zentrifugalkraft entstanden ist, bleibt nach der völligen Abkuglung nicht lange „stabil“: Bereits 10^m nach der Abrundung zeigen sich die ersten Anzeichen einsetzender Trennung, die Annahme der Dreiecksgestalt.

Aus dem Zeitrafferlaufbild geht hervor, daß die nach außen konvexen Seiten dieses Dreiecks mit abgerundeten Ecken nicht dauernd die gleiche Länge aufweisen: das Entoplasma des Riesenaggregates, aus etwa acht primären Pseudoindividuen frisch zusammengesetzt, führt sehr langsame Bewegungen aus, die zuerst die Kugelgestalt in die Dreiecksform überführen und dann die Dreiecksgestalt selbst langsam ändern, ein sehr eindrucksvoller Vorgang im beschleunigten Laufbild (Abb. 5, d und e).

Auffällig ist auch hier wieder, daß die Trennung keine Rücksicht auf die von der Plasmogamie herrührenden noch mehr oder weniger deutlich sichtbaren Grenzen der „verschmolzenen“ primären Pseudoindividuen nimmt, sondern daß diese nach zunächst noch nicht geklärten inneren physiologischen und wohl auch rein mechanischen Gegebenheiten durchschnitten werden.

Auf Grund anderer Beobachtungen an derartigen „Dreieckaggregaten“ war auch hier zu erwarten, daß drei „neue“ „tertiäre Pseudoindividuen“ durch Auseinanderweichen, zwar nicht völlig synchron, aber doch zeitlich kurz nacheinander (Abb. 5, a—l) entstehen würden. Es wird jedoch nur ein kleines Aggregat (A) abgetrennt. Die Gestalt des übrigbleibenden B läßt erwarten, daß B sich bald in zwei weitere kleinere Aggregate trennen wird; es tritt jedoch keine weitere Streckung, sondern eine Verkürzung von B ein. Es entsteht die Frage, ob die drei Plasmogamien, die während der Trennung von A und B mit B stattfinden (es verschmelzen kurz nacheinander C, D und E mit B), die Ursache sind, daß eine weitere Auf-

spaltung von *B* unterbleibt. Es ist dies als sehr wahrscheinlich anzusehen; jedoch ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß mehrfach während einer Plasmogamie eine Trennung stattfand. Im Falle der Einstellung 62 (Abb. 3) kommen drei neue Partner kurz nacheinander in Berührung mit *B*, und zwar zu einem Zeitpunkt, in dem man, auf Grund vieler Beobachtungen, bei *B* die ersten Anzeichen einer bald einsetzenden Trennung bestimmt erwarten sollte. Vielleicht ist die Tatsache von wesentlicher Bedeutung, daß *C* und *D* an den beiden äußersten Enden von *B* ihre Plasmogamie einleiten und dann *E* noch seitlich nahe bei *C* als störender Faktor hinzukommt. Die sehr frühzeitige Berührung mit drei „Partnern“ — früh im Hinblick auf das Sichtbarwerden erster Trennungsanzeichen — hat wahrscheinlich eine „Umstimmung“ von *B* im Sinne einer „Hemmung“ etwa bereits angelaufener innerer Vorbereitungen zur Durchschnürung bewirkt. Zur Zeit kann weder über diese cytologischen inneren Vorbereitungen noch über die Art eines etwaigen Einflusses neu hinzugekommener Plasmogamiepartner Genaueres ausgesagt werden. Dies wird erst möglich sein, wenn die Anteile der Beteiligung von Ekto- und Entoplasma am Trennungsvorgang bis ins einzelne bekannt sind; die Verschmelzung von zwei *Actinosphaerien* gerade an den „Polen“ eines bereits langgestreckten großen Aggregates, das bereits in voller Aktion ist, ein Drittel seiner Masse (= *A*) abzuspalten, kann ohne Zweifel eine recht erhebliche Störung der unbekannten inneren Faktoren bedeuten, da beide Vorgänge ja direkt entgegengesetzt sind. Hier ist besonders große Vorsicht in der Äußerung von Vermutungen geboten!

Kontrolle der Einstellung 62 (Abb. 4, *a'*, *b'*)

Nach einer Unterbrechung von 11^h 44^m wurde ein großes, vollkommen abgerundetes Aggregat von 305 μ Durchmesser aus dem gleichen Präparat wie das Objekt der Abb. 3 unter dem gleichen Raffungsgrad aufgenommen.

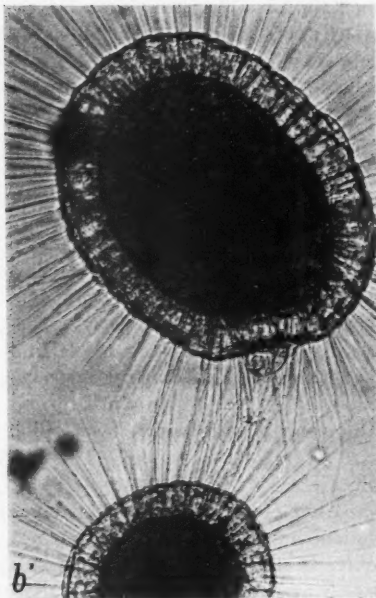
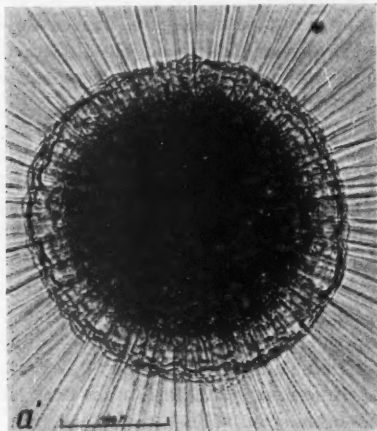
Teilbild *a'* der Abb. 4 zeigt, daß das Aggregat bestimmt noch aus mehreren *Actinosphaerien* zusammengesetzt ist; es weist sehr lange Axopodien auf. Nach 48^m läßt das Aggregat eine starke Abplattung erkennen; es bewegt sich (unter Zeitraffung beobachtet) jetzt sehr schnell. Seine Maße sind nunmehr: 309 \times 267 μ ; der kleine Durchmesser liegt in der Bewegungsrichtung. 12^m später hat sich die Gestalt des Aggregates in ein Ellipsoid verändert. Größter Durchmesser: 313 μ , kleinster Durchmesser: 266 μ ; Höhe des Ektoplasma: 37 μ .

Teilbild *b'* (1^h 19^m 44^s seit *a'*) zeigt ein kleineres Aggregat (210 \times 186 μ), das sich von unten dem großen nähert; es hat ebenfalls die Gestalt eines Ellipsoids und ist bereits in den Axopodienbereich des großen Aggregates geraten. Einige Axopodien sind in direkter Berührung und verhalten sich so, als ob sie gegenseitig Beuteobjekte wären; sie „verkleben“ an den Berührungsstellen miteinander und nehmen hier einen flüssigeren Zustand an (in der Mitte zwischen den beiden Aggregaten). Das große Aggregat hat an der Basis der distal in Kontakt geratenen Axopodien eine Eindellung ausgebildet, in deren Mitte sich eine halbkugelige Plasmavorwölbung be-

findet. Der Vorgang erinnert an den Beginn einer temporären Brückenbildung (W. Kuhl 1951, Einstellung 50; Abb. 11, 12), die vielleicht in diesem Falle nur infolge der zu großen Geschwindigkeit der Ortsbewegung

der Aggregate nicht zustande gekommen ist. (Bei subjektiver Betrachtung des Präparates ist auch von der schnelleren Bewegung dieser vor 15 Stunden einer halbstündigen Zentrifugierung ausgesetzten Tiere nichts zu beobachten.)

5,5^m später sind die Aggregate aneinander vorbeigeglitten, ohne daß es zu einer temporären Brückenbildung oder zu einer Plasmogamie gekommen ist. An den Axopodien ist keine Spur der bei *b'* beobachteten Vorgänge mehr zu sehen.



Zusammenfassung über die Kontrollaufnahme (Abb. 4)

Aus der Kontrollaufnahme geht hervor, daß etwa 12 Stunden nach der Zentrifugierung offenbar keine Trennungen in größerem Umfange mehr stattfinden; es ist somit eine Art Gleichgewichtszustand in der Zusammensetzung der immer noch großen Aggregate eingetreten. Bemerkenswert ist die Vergrößerung der Geschwindigkeit des großen Aggregates und die damit verbundene einseitige Abplattung $\frac{1}{2}$ Stunde nach Beginn der Raffer-Film-Aufnahme diese Abflachung wird bei der schnellen Be-

Abb. 4 (Einstellung 62). Kontrollaufnahme eines Aggregates aus dem Material der Abb. 3; 12 Stunden nach der Zentrifugierung. Es finden keine Trennungen mehr statt. *b'*: Abplattung des Aggregates; nach der Zentrifugierung meist stark ver-

größerte aktive Bewegung der *Actinosphaerien*. Sie ist verbunden mit mehr oder weniger großer Abweichung von der Kugelgestalt: das physiologische „Vorderende“ ist flacher als das „Hinterende“. In *b'* in bezug auf das kleinere Tier phobische Reaktion. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

wegung immer beobachtet, jedoch nur nach vorhergehender Zentrifugierung oder nach Pressung. Die einseitige Abflachung wird wieder ausgeglichen; das nunmehr vorliegende Ellipsoid bewegt sich mit der gleichen Geschwindigkeit weiter.

Die mit relativ großer Geschwindigkeit aneinander vorbeigleitenden verschieden großen, im optischen Schnitt elliptischen Aggregate können infolge dieser erhöhten Geschwindigkeit eine eingeleitete temporäre Plasmabrücke nicht zur Ausbildung bringen. Bei der in b' sichtbaren vorgewölbten Plasmahalbkugel, die den Eindruck der Endphase einer Brückenbildung erweckt, handelt es sich hier wohl nicht um mehr oder weniger verschmolzene, dislozierte ektoplasmatistische Flüssigkeitsalveolen des großen Aggregates, sondern um die verschmolzenen proximalen Teile der Axopodien, die in der Mitte zwischen beiden Tieren für kurze Zeit die typische „Beutereizreaktion“ zeigten.

III. Pressungsversuche

Das Versuchstier wurde unter ein Deckglas von 20×22 mm gebracht, das an den vier Ecken kleine angeschmolzene Paraffinfüßchen trug, und möglichst in die Präparatmitte gebracht. Zunächst wurde das *Actinosphaerium* ohne irgend welche Druckbeeinflussung unter Zeitraffung aufgenommen.

Der Druck wurde mit Hilfe einer starren kreisförmigen Metallöse von etwa 9 mm Durchmesser auf das Deckglas ausgeübt, die mittels eines kurzen Stieles an einem Nadelhalter befestigt war. Auf diese Weise konnte die Deckglasmitte gleichmäßig durchgebogen und ein bequemer regulierbarer Druck auf das Versuchstier ausgeübt werden. Beim Nachlassen des Druckes federt das Deckglas meist nahezu in die Ausgangslage zurück.

Über das Prisma des seitlichen Einblickrohres kann der Wirkungsgrad der durch das Deckglas auf das Tier übertragenen Pressung genau kontrolliert und abgestuft werden. Jederzeit kann der Zeitraffermotor wieder eingeschaltet werden. Das Zeitrafferlaufbild zeigt dann den mikrodynamischen Vorgang der gegebenenfalls eingetretenen Störung oder Dauerschädigung der Cytoplasmastrukturen infolge der Pressung und die nach Aufhebung des Druckes einsetzende Wiederherstellung des Normalzustandes, die Restitution.

Auch bei den hier sehr eindrucksvoll in Erscheinung tretenden Leistungen der lebenden Protozoenzelle ermöglicht erst die Änderung des Zeitfaktors eine direkte Beobachtung der Restitutionsvorgänge im Zeitrafferlaufbild.

Greif (1867) und Penard (1904) zerquetschten *Actinosphaerium* in eine größere Anzahl von Stücken, die unter dem Deckglas wieder „verschmolzen“.

Die verschiedenen Grade der Pressung liegen innerhalb der Grenzen: sehr geringer Druck, so daß die Tieroberfläche gerade berührt wird, bis zur völligen Zerquetschung der kugeligen Zelle.

Einstellung 59, Abb. 5, zeigt ein *Actinosphaerium*, das 50^m vorher leicht gepreßt wurde; bereits 30^m nach Aufnahmebeginn setzt wieder eine lebhaftere Ortsbewegung des Tieres ein. Die Zahl der Axopodien ist gegenüber dem Zustand unmittelbar nach der Pressung mindestens verdoppelt,

ihre Länge ist nahezu wieder wie vor der Pressung. Das Tier weist eine Abweichung von der Kugelgestalt auf (größter Durchmesser: $303\ \mu$, kleinster Durchmesser: $280\ \mu$), eine Gestaltänderung, die häufig bei experimentell beeinflussten Tieren festgestellt wurde, die sich schneller als normal bewegen, und zwar ausschließlich bei solchen (vgl. Einstellung 62, Abb. 3, 4, Zentrifugierversuch). Die Bewegung war nie so schnell, daß sie bei einfacher subjektiver Beobachtung sichtbar wurde. Es ist auf die Oberfläche des Tieres eingestellt, so daß man sehr klar die polygonal gegeneinander abgeflachten ektoplasmatischen Wände der Flüssigkeits-

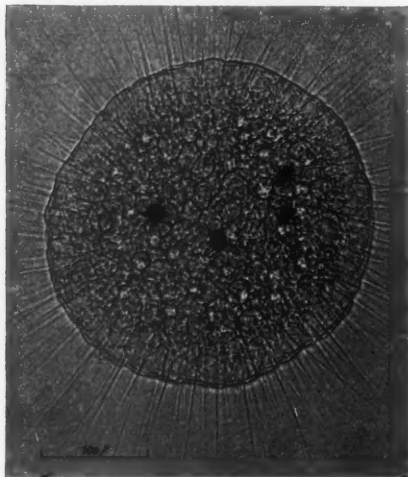


Abb. 5 (Einstellung 59). Pressungsversuch: Das *Actinosphaerium* wurde 50^m vor der Filmaufnahme leicht gepreßt. 30^m nach Aufnahmebeginn wieder lebhaft Ortsbewegung des Tieres. Leichte Abweichung von der Kugelgestalt. Oberflächeneinstellung; polygonal gegeneinander abgeflachte ektoplasmatische Wände der Flüssigkeitsalveolen. Kerne erscheinen hell. Teilstrich $= 0,1\text{ mm}$.

Abb. 6, Teilbild a, zeigt den scheinbar hoffnungslosen Zustand des *Actinosphaerium* nach dem Nachlassen des Druckes. Die Grenze von Ekto- und Entoplasma besteht nicht mehr; die ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen sind gewaltsam aus ihrer normalen Lage gebracht worden; ihre durch gegenseitigen Druck normalerweise bewirkte polygonale Abplattung ist demgemäß aufgehoben und die Alveolen erscheinen fast durchweg abgekugelt. Das in der Zelle oben gelegene Ektoplasma ist infolge des Druckes in das tiefer gelegene Entoplasma hineingedrückt worden; so kommt es, daß

vakuolen erkennen kann. Über zwei Dutzend hell erscheinende, oberflächlich gelegene Kerne sind zu beobachten.

Die nun folgenden Versuche sind nach steigendem Grade der Pressung angeordnet.

Einstellung 65 (Abb. 6, a—j). Ein *Actinosphaerium* wurde durch kurzen Druck auf das Deckglas so stark gepreßt, daß sogar ein kleines Teilstück abgesprengt wurde. Dieses kleine Teilstück kugelt sich sofort ab und zeigt schon nach 6^m wieder einige kleine Axopodien. Die ersten Veränderungen der lebenden Zelle wurden sofort nach Aufhören des Druckes auf das Deckglas unter Zeitraffung gefilmt.

Howland (1928) nimmt an, daß die unter dem Deckglas durch Druck zerklüftete „vegetative Masse“ eines *Actinosphaerium* meist nur deshalb wieder zur ursprünglichen Form verschmelzen kann, weil die verbindenden Cytoplasmafäden nicht abgerissen sind. Es handelt sich in diesen Fällen demnach oft nur um ein „Kontraktionsphänomen“.

jetzt in der Mitte des „Tierrestes“ einzelne große mehr oder weniger abgekugelte Flüssigkeitsvakuolen inmitten von entoplasmatischen Strukturen liegen. Im Teilbild, unten, liegt ein durch den Druck frei gewordener größerer Nahrungsrest, etwas rechts oberhalb von ihm eine durch den Druck geplatze Nahrungsvakuole mit z. T. ausgeschleuderten kleinen Nahrungsteilchen. Die Größe der aus dem „Verbande“ der Rindenschicht herausgerissenen ektoplasmatischen Alveolen schwankt etwa zwischen 16μ und 24μ . Axopodien sind nicht mehr zu erkennen; 19^s später sind bereits vier neue kleine Axopodien mit Sicherheit feststellbar. In Teilbild *b* (37^s seit *a*) hat sich die gesamte durcheinandergebrachte Cytoplasmamasse allseitig etwas zusammengezogen. Die neugebildeten kleinen Axopodien stehen wirr nach allen Richtungen, da noch kein geordnetes Ektoplasma mit radiär eingestellten Wänden der Flüssigkeitsvakuolen vorhanden ist. Im Bilde oben erkennt man, daß diese „Neuordnung“ der „Rinde“ gerade einsetzt. Eine Anzahl großer Flüssigkeitsvakuolen berührt sich bereits wieder, die gegenseitige Abplattung setzt langsam ein.

Nach Howland (1928) ist das hochgradig vakuolisierte Cytoplasma von *Actinosphaerium* sehr klebrig. Es ist nicht leicht, diese Beobachtung mit den unter Änderung des Zeitfaktors erkennbar werdenden Lageveränderungen der durch Druck aus ihrem normalen Verband gebrachten ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen in Einklang zu bringen.

Aus diesem vitalen „Näherungsvorgang“, bei dem sich nach erfolgter Berührung der Vakuolenwände (unter noch einer ungeklärten Druckwirkung) eine polygonale Gestalt ergibt, geht einwandfrei hervor, daß die polygonalen Wände der Flüssigkeitsvakuolen im Ektoplasma von *Actinosphaerium* entstehungsgemäß „Duplikaturen“ sein müssen, deren Zusammenhang experimentell, z. B. durch Pressung mit nachfolgendem Aneinandergleiten, gelöst werden kann. Daher folgt auch die Verankerung der Axopodien im Entoplasma den radiär gestellten Wänden der Flüssigkeitsalveolen.

In der folgenden halben Minute werden die besonders weit aus dem Ektoplasmaverband herausgedrückten großen Alveolen „hereingeholt“. Wie dieser scheinbar so einfache Vorgang mikrodynamisch aufzufassen ist, bleibt zunächst noch unklar. Im Zeitrafferlaufbild ähnelt die Um- und Einordnung durch Druck verlagelter Teile des grobalveolären Ektoplasma den unter Zeitraffung dargestellten cytolisthetischen Bewegungen an Blastomerenaggregaten, die vorher künstlich aus ihrem Zellverbande isoliert wurden (*Psammedhinus*, *Triturus*, [W. und G. Kuhl 1937]).

Isolierte Strukturelemente einer polyenergiden Protozoenzelle verhalten sich mikrodynamisch — unter Zeitraffung beobachtet — also ähnlich wie isolierte ganze Zellen (Blastomere) von Metazoenkeimen. Wie weit dieses bewegungsphysiologisch ähnliche Verhalten auf gleichen ursächlichen Gegebenheiten beruht, muß erst noch untersucht werden. In beiden Fällen werden normalerweise polygonal gegeneinander abgeplattete Gebilde (hier die radiär angeordneten Wände der ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen, dort die ähnlich gelagerten Blastodermzellen (Ektodermzellen) des sich furchenden Keimes aus dem Zusammenhang befreit, was

ihre sofortige Abkuglung zur Folge hat, und dann gleiten sie unter erneuter Abplattung solange aneinander („Cytolisthesis“, W. Roux), bis ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht ist: hier eine wohlgeordnete Ektoplasmastruktur, dort ein Blastomerenaggregat, das je nach seiner Größe noch mehr oder weniger lange lebensfähig bleiben kann.

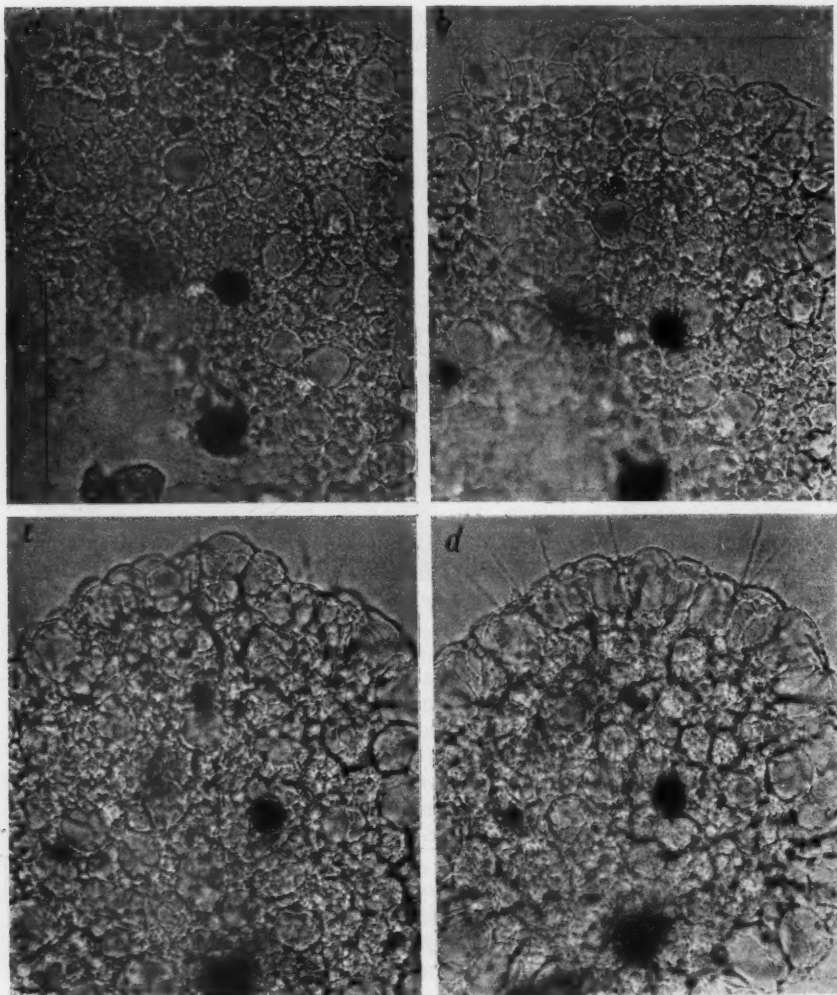
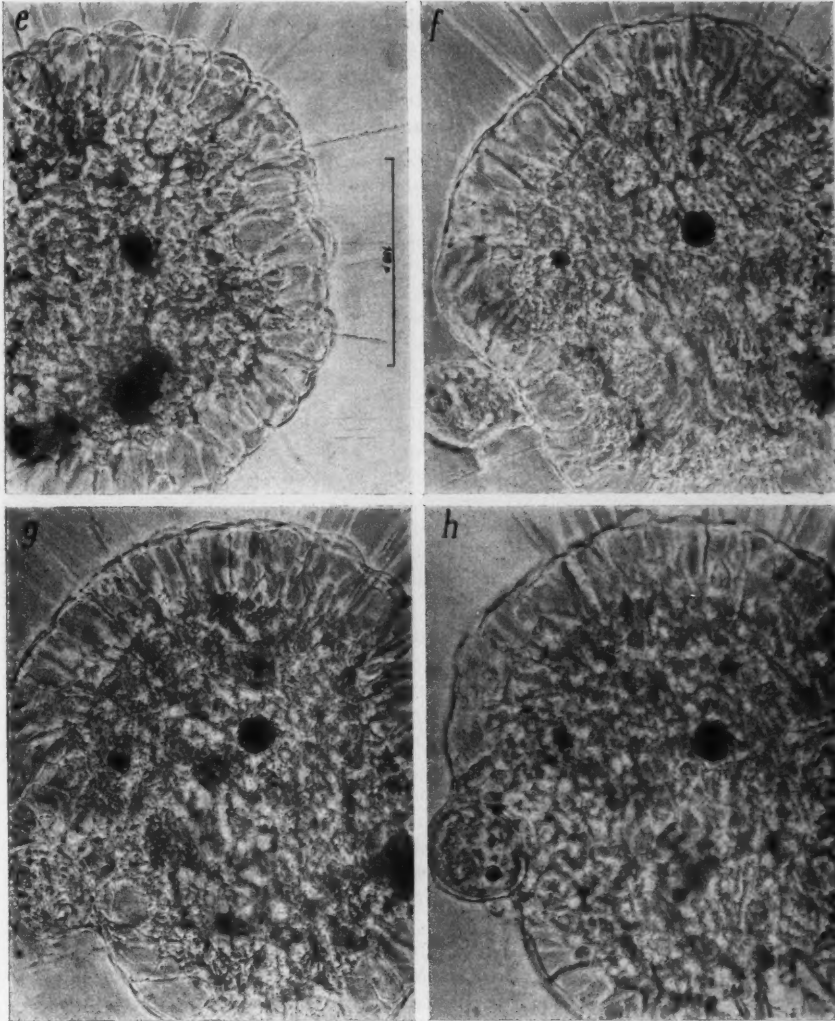


Abb. 6 (Einstellung 65). Starke Pressung eines *Actinosphaerium* durch kurzen, heftigen Deckglasdruck (a). 30s nach Nachlassen des Druckes bereits wieder die ersten Andeutungen von Axopodien. Durch den Druck sind die ektoplasmati-

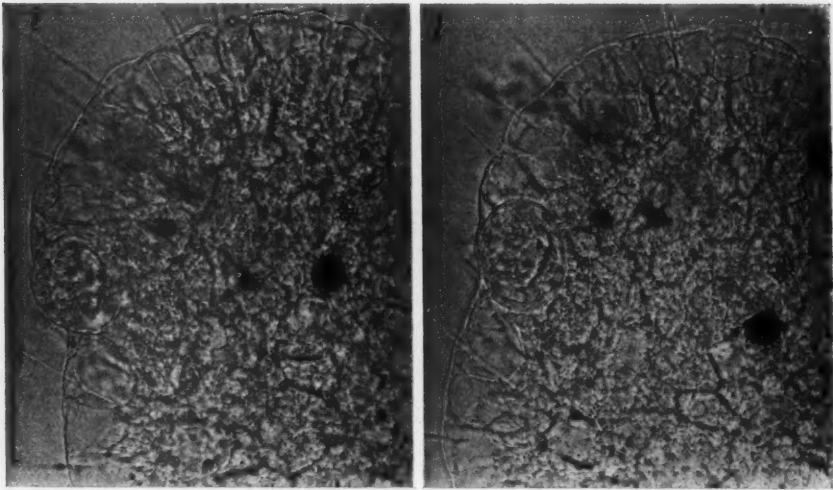
In Teilbild *c* (51^s seit *b*) zeigt sich das Ektoplasma bereits etwas deutlicher abgesetzt, jedoch ist der Außenkontur des Tieres noch nicht glatt. Offenbar ist das Tier immer noch leicht abgeflacht, obwohl der experimentell gesetzte Druck seit 1^m 28^s aufgehört hat (sonst wäre es nicht möglich, bei



schon Flüssigkeitsalveolen in das Entoplasma hineingedrückt worden (*b*, *c*, *d*). Sehr bald Neuordnung der Alveolen zur „Rindenschicht“ (*e*, *f*, *g*). Etwa 20^m nach Aufnahmebeginn berührt abgesprengtes Teilstück die restituierte „Rindenschicht“ (*f*).

dem verwandten Apochromat 8 mm auch den zentralen Teil des Tieres gleichzeitig scharf abzubilden). Beim Zentrifugierungsversuch bleibt ja auch u. U. die abgeflachte Gestalt längere Zeit erhalten. Die Axopodien sind länger geworden, stehen aber, aus dem oben angegebenen Grunde, noch nicht wieder radiär.

In den folgenden Minuten „schließen sich“ in der zentralen Oberfläche die getrennten großen Flüssigkeitsvakuolen immer mehr flächenhaft zusammen, z. T. bereits unter polygonaler Abflachung. In den Zwischenräumen ist die feingranulierte Entoplasmastruktur zu erkennen. So nimmt die „Ordnung“ in kurzer Zeit zu, ein sehr eindrucksvolles Geschehen im Zeitrafferlaufbild.



Das abgekugelte Teilstück „gleitet“ mit kontinuierlicher Geschwindigkeit durch das Ektoplasma (sechs Phasen bei diesem Vorgang; s. Text) (f—j). Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

In Teilbild *d* der Abb. 6 (2^m 7^s seit *c*) stehen die Axopodien fast völlig radiär. Das neugeordnete Ektoplasma besteht jetzt wieder nahezu aus einer „Lage“ fast gleich großer Flüssigkeitsvakuolen; auf der rechten Seite ist die Anordnung noch etwas gestört.

Teilbild *e* (1^m 50^s seit *d*; 5^m 30^s seit *a*) zeigt, daß die rechte Störungsstelle nun auch fast ganz ausgeglichen ist. Man vergleiche *e* mit *a* um die ungemein schnelle Restitution der Zelle nach dem immerhin erheblichen Eingriff 5½^m zuvor richtig zu werten! Die rechts und links vom (im Bilde nicht zu sehenden) Achsenstab auf den Axopodien sichtbaren kleinen Plasmaanschwellungen und Körnchen sind ein Anzeichen für die nunmehr erfolgende rasche Verlängerung der Axopodien.

In der zentralen Region sind jetzt kaum mehr große Flüssigkeitsvakuolen zu erkennen. Da in der Zwischenzeit nicht fokussiert wurde, sind demnach Verlagerungen eingetreten, d. h. das *Actinosphaerium* hat sich stärker abgekugelt: die zentrale Oberfläche liegt nun nicht mehr im Bereiche der Schärfentiefe des Objektivs.

Die folgenden Teilbilder der Einstellung 65, Abb. 6, *f*–*j*, zeigen 1. den weiteren Verlauf der Restitution des *Actinosphaerium* und 2. die Einverleibung des oben bereits erwähnten, bei der Pressung abgelösten kleinen Teilstückes.

Aus Teilbild *f* (16^m 20^s seit *e*; 21^m 50^s seit *a*) geht hervor, daß die Abkuglung des Tieres nunmehr beendet ist. Der Außenkontur verläuft jetzt beinahe wieder so glatt wie beim unbeeinflussten Tier. Die Grenze zwischen Ekto- und Entoplasma bildet noch nicht eine scharfe Linie, weil sich die proximalen Anteile der ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen noch mehr oder weniger halbkugelig in das Entoplasma vorwölben. Links unten berührt das erwähnte, bei der Pressung losgelöste Teilstück das Ektoplasma, das hier bereits eine erhebliche Eindellung aufweist. Der abgekugelte Teil hat einen Durchmesser von 44 μ . Die Eindellung war schon zu bemerken, bevor eine direkte Berührung vorlag. In Anbetracht der geringen Größe des Teilstückes in bezug auf die Masse des *Actinosphaerium*, von dem es losgelöst wurde, kann in diesem Falle mit Sicherheit angenommen werden, daß die Eindellung des Ektoplasma vor Eintritt des Kontaktes ein aktiver Vorgang ist. Ob ihm ein rein chemischer, durch das Wasser übermittelter Reiz zugrunde liegt oder eine Art Reizleitung über die vom sich nähernden Teilstück zuerst berührten Axopodien, also ein mechanischer (taktiler) Reiz vorliegt oder ob eine Kombination von chemischen und mechanischen Reizen in Frage kommt, läßt sich noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

Offensichtlich wird das vom gepreßten Tier stammende Teilstück wie ein Beuteobjekt behandelt. Im unteren Berührungswinkel beobachtet man eine hyaline Protoplasamasse, die wahrscheinlich von mehreren „eingeschmolzenen“ Axopodien her stammt. An dieser Stelle ist dadurch bereits eine innige Verbindung mit der Oberfläche des *Actinosphaerium* hergestellt. Eine halbe Minute später hat die Eindellung ihren maximalen Wert erreicht. Im Mikrozeitrafferlaufbild wird der Eindruck eines kontinuierlichen, langsamen Gleitens durch das Ektoplasma erweckt, ähnlich wie bei der Defäkation, nur in umgekehrter Richtung (W. Kuhl 1951, Einstellung 46; Abb. 22). Auch aus dem Zeitrafferlaufbild läßt sich zunächst noch kein sicherer Einblick gewinnen in die auch hier wieder auftauchende bedeutungsvolle Frage: „Wer bewegt wen?“ Dies soll nicht etwa heißen, daß angenommen wird, das „Beuteobjekt“ presse sich aktiv durch das sehr widerstandsfähige „Gewölbe“ der ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen hindurch, sondern bezieht sich nur auf das Verhalten des Ekto- und Entoplasma in der Durchtrittszone. Auf jeden Fall müssen an der Durchtrittsstelle mindestens vier bis sechs ektoplasmatische Alveolen aus ihrem Verband verschoben werden, um dem 44 μ großen kugeligen „Beuteobjekt“ den Durchtritt zu ermöglichen.

Teilbild *g* (1^m 12^s seit *f*) zeigt, daß die Eindellung etwas flacher geworden ist. Das Teilstück ist jetzt auch oben (im Bilde) durch hyalines Plasma mit der Ektoplasmaoberfläche verbunden. Etwa in der Breite des Beuteobjektes sind in der Rindenschicht an der Stelle der Einverleibung keine Flüssigkeitsvakuolen mehr zu bemerken, es liegt vielmehr eine ziemlich ungeordnete Struktur vor mit unregelmäßig gestalteten, z. T. polygonalen Alveolenwänden. Die Eindellung des Ektoplasma bewirkt im Entoplasma in dieser Zone offenbar eine dunklere, „dichtere“ Struktur. In der Umgebung der veränderten Ektoplasmastruktur am Grunde der Eindellung bemerkt man einige Flüssigkeitsvakuolen, die ihre radiale Einstellung verloren haben und mehr tangential angeordnet sind.

Diese Phase *g* zeigt sehr deutlich die außerordentliche Kompliziertheit eines scheinbar so einfachen Vorganges der Einverleibung eines kleinen kugeligen „Beuteobjektes“, sobald man sich einmal der Mühe unterzieht, ein derartiges Geschehen in seine einzelnen mikrodynamischen Komponenten zu zerlegen! Zum Vergleiche ziehe man die Wiederaufnahme der halbkugeligen Hälfte einer „temporären Plasmabrücke“ in das *Actinosphaerium* nach dem Zerreißen des plasmatischen Verbindungsfadens heran (W. Kuhl 1951, Einstellung 50, Abb. 11, 12).

Im weiteren Verlaufe der Wiederaufnahme des arteigenen Teilstückes wird die Eindellung langsam in dem Maße ausgeglichen, in dem die „Beute“ eindringt. In Teilbild *h* (3^m 22^s seit *g*; 26^m 24^s seit *a*) steckt das „Beuteobjekt“ zu ungefähr einem Drittel im Körper des *Actinosphaerium*; es steht jetzt direkt mit dem in die ehemalige Ektoplasmazone vorgedrungenen Entoplasma in Berührung.

6^m später, in Teilbild *i*, ist das Objekt zu etwa vier Fünfteln aufgenommen; es ist immer noch kugelig. Weitere 2^m 24^s später, Teilbild *j*, kann die Aufnahme als im wesentlichen beendet angesehen werden. Ein dünner „Protoplasmafilm“ schließt die Stelle der Einverleibung nach außen ab. Das „Beuteobjekt“ ist jetzt leicht abgeplattet; sein kleinster Durchmesser liegt ungefähr in der Richtung seiner Verlagerung in das Entoplasma.

Zusammenfassung über die Einstellung 65 (Abb. 6, *a*–*j*)

Trotz starker Störung der Sonderung des Cytoplasma in Ekto- und Entoplasmastrukturen durch einen kurzen, aber heftigen Druck auf das Deckglas erscheinen bereits 30^s später wieder die ersten Andeutungen von Axopodien. 2³/₄^m nach Aufhören des Druckes ist bereits die Neugliederung von „Rinden- und Markschrift“ deutlich. Nach 5¹/₂^m ist diese Sonderung soweit gediehen, daß eine deutlich vom Entoplasma abgesetzte Ektoplasmaschicht vorhanden ist, die aus grob vakuolisierten Flüssigkeitsalveolen besteht, die distal und proximal zwar noch vorgewölbt sind, seitlich jedoch bereits wieder vorwiegend radial eingestellte Plasmawände aufweisen.

22^m nach Versuchsbeginn kommt ein offenbar bei der Pressung losgelöstes Teilstück in Berührung mit dem Versuchstier, zu dem es gehört; in 15^m ist es „einverleibt“. Im Zeitrafferlaufbild stellt sich dieser Vorgang als ein „Hineingleiten“ des Objektes in das *Actinosphaerium* mit gleichblei-

bender Geschwindigkeit dar. Dies ist nur möglich, wenn die relativ starre und widerstandsfähige grobvakuolisierte Ektoplasmastruktur für den Durchtritt des „Beuteobjektes“ vorbereitet, d. h. lokalisiert umgeformt wird.

Es spielen sich hierbei folgende Vorgänge ab: 1. Eindellung der Kugel-

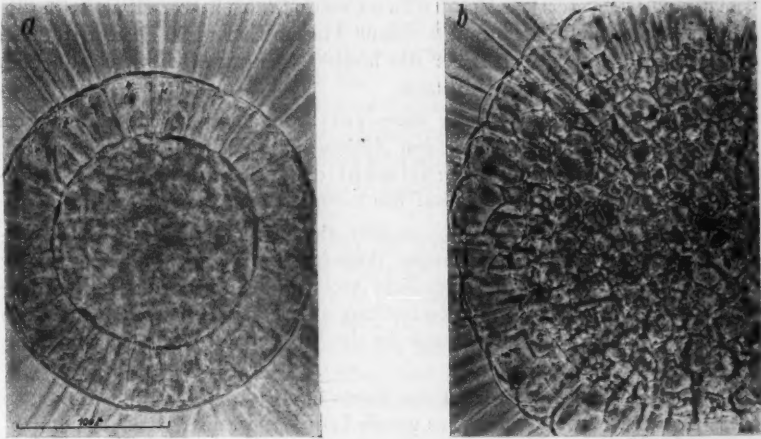
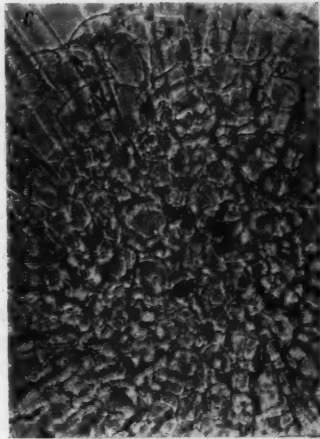


Abb. 7 (Einstellung 70). a: *Actinosphaerium* vor Anwendung einer anhaltenden Pressung. b und c: Die Wirkung. Die polygonalen Flüssigkeitsalveolen des Ektoplasma sind bei mechanischen Beanspruchungen leicht verschiebbar gegeneinander. Trotz des starken Druckes werden sie nicht unter Abkuglung frei oder platzen gar. Die Wände sich berührender ektoplasmatischer Flüssigkeitsalveolen stellen Duplikaturen dar, daher die große Gleitfähigkeit bei Pressung und die Fähigkeit zur Neuordnung. Unter Druck distal stark vorgewölbte Alveolen kennzeichnen den in ihnen herrschenden Binnendruck. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.



oberfläche des *Actinosphaerium* an der Berührungsstelle mit dem „Beuteobjekt“. 2. Verkleben des Objektes mit der ektoplasmatischen „Grenzschicht“: *Actinosphaerium*/Wasser durch freies, offenbar durch Einschmelzung von Axopodien hier verfügbares (unter Zeitraffung sehr bewegliches) Protoplasma. 3. Umgestaltung der notwendigen Anzahl von Flüssigkeitsvakuolen für die Ermöglichung des Objekt-Durchtritts durch das Ekto-

plasma bzw. Beiseitedrängung dieser Alveolen; ob dies aktiv durch das „Beuteobjekt“ geschehen kann, ist mehr als zweifelhaft. 4. An Stelle der normalen Ektoplasma- tritt Entoplasmastruktur. Offenbar wird peripher gelegenes Entoplasma in die „Öffnungspforte“ aktiv befördert. 5. Das Objekt kann nunmehr „eindringen“ bzw. hinein-„befördert“ oder „gezogen“ werden. (Es ist hier wieder einmal fast unmöglich, eine wirklich zutreffende Nomenklatur anzuwenden!). 6. Unmittelbar nach der Einverleibung schließt eine sehr dünne Plasmaschicht die Durchtrittsstelle nach dem Wasser hin ab. Über die hierbei wirksamen „Kräfte“ läßt sich leider noch nichts Sicheres aussagen.

Abb. 6 zeigte die Wirkung eines zeitlich kurzen, aber heftigen Druckes auf das Cytoplasma von *Actinosphaerium* und die nachfolgende Restitution. Wie wirkt nun eine allmählich durchgeführte starke Pressung von längerer Dauer auf die Cytoplasmastrukturen ein?

Einstellung 70, Abb. 7, a—c, läßt die Ergebnisse eines solchen Versuches erkennen. Das Versuchstier (Durchmesser: 214μ) hat die relativ hohe Rindenschicht von 39μ ; es liegt völlig ruhig (Teilbild a). Das Tier wurde 12^m unbeeinflusst unter Zeitraffung aufgenommen. Im Zeitrafferlaufbild wurden keine Veränderungen an den Flüssigkeitsvakuolen des Ektoplasma sichtbar.

Teilbild b gibt den Eindruck des Tieres unmittelbar nach dem Einsetzen der Dauerpressung wieder; es wurde kein Wasser zugesetzt. Der Durchmesser des Tieres ist infolge des Druckes von 214μ auf 344μ vergrößert worden, also um 38%! Die Höhe des Ektoplasma beträgt jetzt ungefähr 43μ . Es liegt nunmehr eine stark abgeplattete Kugel vor; der Durchmesser des Entoplasma ist jetzt von 136μ vor der Pressung auf 226μ erhöht. Das Ektoplasma hat im wesentlichen seine Höhe beibehalten (43μ gegenüber 39μ); bei der Art des angewandten Druckes und der mikroskopischen Beobachtung im durchfallenden Licht ist dies nicht weiter erstaunlich. Eine Verringerung der Ektoplasmahöhe tritt nur oben (dicht unter dem das Tier bei der Pressung berührenden Deckglas) und unten (an der Berührungsstelle mit dem Objektträger) ein. Die in den freien Raum zwischen Deckglas und Objektträger in das Wasser ausstrahlenden Axopodien sind durch den Druck nicht verändert.

Infolge des Druckes sind die polygonal abgeplatteten ektoplasmatischen Alveolen in ihren Abgrenzungen und Überschneidungen sehr deutlich zu erkennen; im Gegensatz zum unbeeinflussten Tier (a) wölben sie sich stark über die Zelloberfläche vor.

In Teilbild c ($11^m 54^s$ seit b) ist auf die Oberfläche scharf eingestellt; die Pressung dauert an. Der grobvakuolisierte Bau des Ektoplasma kommt hier besonders schön zum Ausdruck. Das Entoplasma tritt strukturell nicht in Erscheinung; es wird infolge des anhaltenden Druckes zu einer dünnen Schicht flächenhaft ausgebreitet. Ob aus diesem Grunde seine beim unbeeinflussten Tier fein granuliert Struktur nicht mehr erkennbar ist, oder ob diese Struktur durch die Pressung relativ schnell verändert wird, kann noch nicht einwandfrei entschieden werden.

Zusammenfassung über die Einstellung 70 (Abb. 7, a—c)

Starker, allmählich ausgeübter und anhaltender Druck bringt die ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen ebensowenig zum Platzen wie eine plötzliche, starke und kurze Pressung des Tieres. Die polygonalen Alveolen verschieben sich offenbar relativ leicht gegeneinander, ohne in diesem Falle frei zu werden und sich abzukugeln. Dies hängt mit der schon erwähnten Tatsache zusammen, daß die „Wände“ sich berührender Alveolen „Duplikaturen“ darstellen. Die distal stark vorgewölbten Alveolen deuten den in ihnen herrschenden Binnendruck an.

Bei noch stärkerer, plötzlicher Pressung können Zerreißen der oberflächlichen Regionen von *Actinosphaerium* eintreten, ohne daß es zu Absprengungen von Teilstücken kommt.

Einstellung 68 (Abb. 8, a—f) führt eine derartige Verletzung und die schnelle Heilung der Zelle vor.

Abb. 8, a zeigt das Versuchstier 20^s nach dem Aufhören des Druckes; der größte Durchmesser beträgt 387 μ . Die wenigen noch sichtbaren Axopodien stehen nicht mehr radiär angeordnet. Rechts unten ist infolge der Pressung eine Verletzung entstanden in Form eines abgesprengten „Lappens“ von etwa 135 μ Breite, der in der Mitte rechts noch mit dem *Actinosphaerium* zusammenhängt. Die ober- und unterhalb des scharf eingestellten optischen Schnittes gelegenen Halbkugeln der Zelle sind durch den ausgeübten Druck in die Äquatorebene hineingepreßt worden, daher erscheint die zentrale Entoplasmakugel durchsetzt mit vielen mehr oder weniger abgekugelten ektoplasmatischen Alveolen; nur zwischen diesen erkennt man noch erhalten gebliebene Entoplasmastrukturen.

Das durch den Druck aufgerissene „Loch“ wird von einem gekrümmten Cytoplasmagebilde bis auf eine kleine Öffnung — in der Mitte unten — nach außen abgegrenzt. Dieser Cytoplasmastrang besteht aus etwa 40 ektoplasmatischen Alveolen, die in ihrem Verbinde gelockert sind, was aus der verschieden starken Abkuglung der einzelnen Alveolen hervorgeht. Der Strang endet in einer einzigen, nahezu kugeligen Flüssigkeitsvakuole von 25 μ Durchmesser; sie steht in Berührung mit drei gleichartigen Gebilden. In der Mitte des Stranges scheint noch unverändertes Entoplasma vorzuliegen.

1^m 20^s später (Teilbild b) ist der größte Durchmesser von 387 μ auf 355 μ zurückgegangen. Viele neue Axopodien sind ausgesandt worden. Einige ektoplasmatische Alveolen ragen noch immer weit über die Oberfläche hinaus. Infolge der Kontraktion des Tieres hat sich die rechts unten gelegene Einbuchtung etwas verkleinert. Auch der diese nach außen, bis auf die kleine, 25 μ breite Verbindung des Hohlraumes mit dem Außenmedium, abschließende, vorwiegend aus ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen bestehende Strang hat sich erheblich verkürzt und nach außen einige Axopodien ausgebildet. In Teilbild c (1^m 20^s seit b) erweist sich der Durchmesser auf 322 μ zurückgegangen; die neu gebildeten Axopodien stehen noch wirr nach allen Richtungen, einige auch bereits radial. Die Öffnung der Verletzung ist, im Vergleich zu a, auf etwa ein Fünftel redu-

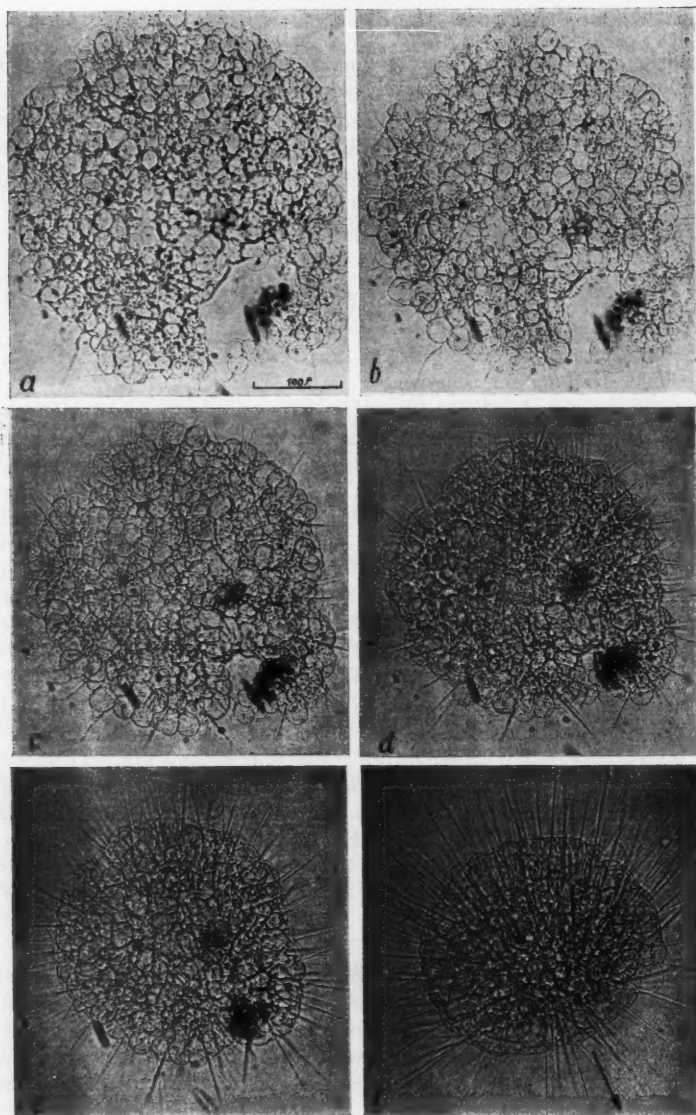


Abb. 8 (Einstellung 68). *Actinosphaerium* nach starker plötzlicher Pressung; Entoplasmastruktur durch hineingedrückte ektoplasmathe „Alveolen“ fast völlig verwischt. *b–e*: Langsame Wiederannahme der Kugelgestalt. Man beachte den Einheilungsvorgang des durch den Druck abgesprengten „Lappens“. Das einseitig

ziert. Das freie Ende des Stranges ist gerade in Berührung mit der gegenüberliegenden Seite gekommen. Im Innern der buchtförmigen Verletzung weisen die den Hohlraum umsäumenden ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen eine Anordnung auf, die den mechanischen Beanspruchungen ihrer Lage entspricht, und zwar liegen sie vorwiegend in einer Reihe und bilden sozusagen ein „inneres Ektoplasma“ (vgl. w. u. Einstellung 77, Abb. 11, d).

3^m später, Teilbild *d* (6^m seit *a*) mißt der Durchmesser des Tieres nur noch 294 μ . Die rechts unten gelegene Öffnung der Verletzung ist bis auf die Größe einer einzelnen ektoplasmatischen Alveole geschlossen, und zwar vorwiegend infolge aktiver Einkrümmung des Stranges (links neben dem dunklen Nahrungsrest). Teilbild *d* zeigt eine mehr oberflächliche Scharfeinstellung. Besonders in der linken Hälfte des Tieres erkennt man sehr klar die z. T. noch ungeordnete Lage der Flüssigkeitsvakuolen, ferner die Ursprungs- oder Verankerungsstellen der Axopodien in den „Zwickeln“ aneinanderstoßender Vakuolenwände. 40^s später ist die Verletzung rechts unten vollkommen verheilt.

Infolge der allmählich „sich“ radiär anordnenden Plasmawände der ektoplasmatischen Alveolen werden die Axopodien entsprechend „aufgerichtet“ und ebenfalls radiär eingestellt. In Teilbild *e* (7^m 20^s seit *d*) ist infolge der allseitigen Kontraktion der Zelle der Durchmesser auf 266 μ abgesunken. Die meisten Axopodien sind jetzt radiär eingestellt und stark verlängert. Die Kontraktion des Tieres bewirkt in den nächsten 18^s noch eine weitere Verringerung des Durchmessers auf 247 μ , den kleinsten nach Aufhebung der Pressung erzielten Wert. Insgesamt verkleinert sich der Durchmesser des *Actinosphaerium* nach der Druckentlastung um 37%. Bis auf die noch stärker vorgewölbte Region der verheilten Stelle der Verletzung hat das Tier wieder nahezu eine regelmäßige Kugelgestalt angenommen. Seit Beginn der Zeitrafferfilm-Aufnahme (*a*) sind 15^m 20^s vergangen. Erst jetzt wird das Wasser des Präparates ergänzt, was ohne sichtbare Einwirkung auf das Versuchsobjekt bleibt.

Nach einer Aufnahmepause von 19^m zeigt das Tier im Zeitrafferlaufbild sehr lebhaft Bewegung. Der größte Durchmesser ist auf 257 μ angestiegen. Bemerkenswert ist, daß sich eine einseitige Abplattung auszubilden beginnt. Weitere 9^m 38^s später sind die Maße: Größter Durchmesser: 271 μ , kleinster Durchmesser: 238 μ ; diese Änderung ist auf die Abflachung zurückzuführen. Teilbild *f* (28^m 56^s seit *e*; 44^m 14^s seit *a*) zeigt den Zustand

freie Gebilde krümmt sich innerhalb von 6^m soweit ein, daß die ehemalige Verbindungsstelle berührt wird; um den Hohlraum werden die Alveolen ähnlich wie in der normalen Rindenschicht angeordnet (*c*). Keine Alveole ist infolge der Pressung geplatzt! Die Teilbilder *b*–*e* zeigen das neue Hervorsprossen der Axopodien. In *e* ist der Hohlraum der Verletzung völlig geschlossen. Nach völliger Restitution (*f*) zeigt das Tier, trotz vorausgegangener starker Verletzung, sehr lebhaft Bewegung (im Zeitrafferlaufbild) in der Pfeilrichtung, verbunden mit starker Abplattung am physiologischen „Vorderende“. Hier viel weniger Axopodien als seitlich und „hinten“. Keine Rotation! Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

des Tieres während dieser lebhaften Phase der Bewegung. Die Axopodien weisen die normale Länge auf; sie sind sehr zahlreich geworden, sind aber unregelmäßig verteilt. Das Tier bewegt sich mit der abgeplatteten Seite voran! Im dargestellten optischen Schnitt erkennt man, daß an der abgeplatteten Seite wesentlich weniger Axopodien stehen als am „physiologischen Hinterende“. Von den seitlichen Axopodien sind einige nach „hinten“ gebogen. Aus dem Zeitrafferlaufbild geht hervor, daß keine Rotation stattfindet.

Zusammenfassung über die Einstellung 68 (Abb. 8, a—f)

Nach Aufhören des experimentell gesetzten Druckes nimmt das Tier wieder langsam die Kugelgestalt an, wobei sich der Durchmesser um 30% verkleinert. Die Pressung bewirkte die Ablösung eines Teilstückes der Zelle, das mit dem Versuchstier in Verbindung bleibt und einen Hohlraum umschließt, der durch eine kleine Öffnung mit dem umgebenden Wasser in Verbindung steht. Am freien Ende dieses Lappens, der vorwiegend aus Ektoplasmaanteilen besteht, liegen nur wenige Flüssigkeitsalveolen in zwei Reihen nebeneinander. Dieses einseitig freie Gebilde krümmt sich nun aktiv innerhalb von 6^m bis zur Berührung des freien Endes mit seiner ehemaligen Verbindungsstelle ein. Dadurch wird der Hohlraum geschlossen und eingeengt. An der inneren Begrenzung des Hohlraumes „ordnen sich“ unterdessen die ihn begrenzenden ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen in einer Reihe an und bilden eine Art „inneres“ Ektoplasma.

Die den „Plasmalappen“ zusammensetzenden Alveolen verhalten sich — unter Zeitraffung beobachtet — sehr ähnlich wie entsprechend gestaltete losgelöste Zellaggregate, die durch Zerreißen eines Seeigelkeimes entstanden sind. Den z. B. bei *Psammechinus miliaris* beobachteten Vorgang des „Zellengleitens“ (= Cytolisthesis, W. Roux) der Blastomere entsprechen, mikrodynamisch gesehen, die Gleit- und Einkrümmungsbewegungen der mehr oder weniger kugeligen Flüssigkeitsvakuolen während des Heilungsvorganges bei *Actinosphaerium*.

Auch der grobvakuolierte „Plasmalappen“ des durch Pressung temporär geschädigten *Actinosphaerium* „krümmt sich“ nach der „richtigen“ Seite ein, genau wie eine ebenfalls durch einen experimentellen Eingriff vom sich entwickelnden Keim losgelöste Blastomerenkette beim Seeigetei. (Unsere Mikrozeitrafferfilme über derartige Versuche zur „Cytolisthese“ künstlich isolierter Blastomere der Seeigel-Blastula und -Gastrula wurden leider auch vor der genauen Auswertung durch Kriegseinwirkung vernichtet.) Die Ähnlichkeit des Verhaltens ganzer Zellen (Blastomere) und von Teilstücken einer Zelle ist verblüffend. Der Durchmesser einer Flüssigkeitsvakuole am Ende des einseitig losgelösten Plasmalappens beträgt 23 μ ; eine Furchungszelle der Vorblastula von *Psammechinus miliaris* mißt etwa 12 bis 14 μ . Die hier in ihrem Verhalten bei Restitutionsvorgängen verglichenen lebenden „Elemente“ weisen also ungefähr die gleiche Größenordnung auf.

Beachtlich ist die relativ starke Vergrößerung der Geschwindigkeit, die nach vollzogener Restitution (nach einer Aufnahmepause von 19^m) unter Änderung der typischen Zellform zu beobachten ist. Ein ähnliches

Verhalten wurde bei den Kontrollaufnahmen des Zentrifugierungsversuches der Einstellung 62 (Abb. 3, 4) festgestellt. In beiden Fällen ist das cytologische Kennzeichen der (ohne Zeitraffung nicht wahrnehmbaren) Geschwindigkeitsvergrößerung die Abplattung des Tieres am physiologischen „Vorderende“. Trotz der Erhöhung der Geschwindigkeit ist auch im Zeitrafferlaufbild kein Rotieren des Tieres um eine in der Richtung des größten Durchmessers gelegene Achse (eine Achse, die also senkrecht zur Bewegungsrichtung liegt) zu beobachten. Aus welchem Grunde etwa viermal so viele Axopodien nach „hinten“ gerichtet sind als nach „vorn“ (Verhältnis etwa 80 : 20), läßt sich ebenfalls nicht mit Sicherheit angeben. Die Bewegung ist doch immerhin noch derart langsam, daß sie durch die „vorn“ an der abgeplatteten Seite gelegenen Axopodien kaum gehindert werden könnte. Die wenigen „vorn“ in der Bewegungsrichtung liegenden Axopodien bieten den normalen, geraden Anblick dar. Axopodien, die an der Grenze zwischen Abplattung und der kugeligen Region liegen, vor allem die tiefer oder höher gelagerten, hier daher unscharf abgebildeten, weisen eine leichte Biegung nach „hinten“ auf.

Einstellung 67 (Abb. 9, a—j), das nächste Beispiel eines Pressungsversuches, beweist eine Restitutionsfähigkeit, die man bei einem *Heliozoon* nicht für möglich gehalten hätte.

Ein *Actinosphaerium* wurde durch gleichförmigen Druck auf das Deckglas völlig zerdrückt. Es entstanden viele kleine Teilstücke, die sich bereits 3^m nach dem Aufhören des Druckes abgerundet haben, und ein großes, mehrfach gelapptes Teilstück, das unter Zeitraffung aufgenommen wurde.

Abb. 9, a stellt dieses große vierlappige Gebilde unmittelbar nach dem Aufhören des Druckes dar. Die einzelnen Fortsätze sind an den Enden keulenförmig verbreitert und hängen in der Mitte, der Zone stärkster Druckwirkung, durch relativ dünne Stiele zusammen. Die größte Längsausdehnung beträgt 518 μ ; der dünne zentrale „Stiel“ ist nur 15 μ breit. In dem rechts unten gelegenen, distal breitesten Fortsatz sind zwei größere, durch die Pressung verursachte Hohlräume sichtbar.

Strukturell besteht der Restkörper des Tieres nach dem Druck aus grob-vakuolisiertem Cytoplasma, ähnlich dem Ektoplasma; von der fein granulierten ehemaligen Entoplasmastruktur ist nichts mehr zu bemerken. Die Gestalt der plasmatischen Wände der Flüssigkeitsvakuolen entspricht den jeweils noch herrschenden Druck- und Zugwirkungen. In den Ausbuchtungen des Restkörpers liegen einige Teilstücke, unten ein größeres.

54^s später erscheint die grob-vakuolisierte Plasmastruktur gleichförmiger infolge des Aufhörens der unmittelbaren Druckwirkungen. Die Enden der Fortsätze zeigen eine leichte Abrundung vorspringender kleiner Teile (Teilbild b). 36^s später, 1 $\frac{1}{2}$ ^m nach dem Teilbild a, werden bereits, trotz völliger Zerstörung der normalen Kugelgestalt, die ersten Andeutungen neuer Axopodien sichtbar. Die beiden Öffnungen im breiten Fortsatz (rechts unten) sind erheblich kleiner geworden.

Teilbild c (1^m 48^s seit b) zeigt die Phase der beginnenden Kontraktion; die größte Längsausdehnung ist von 518 μ (a) auf 486 μ zurückge-

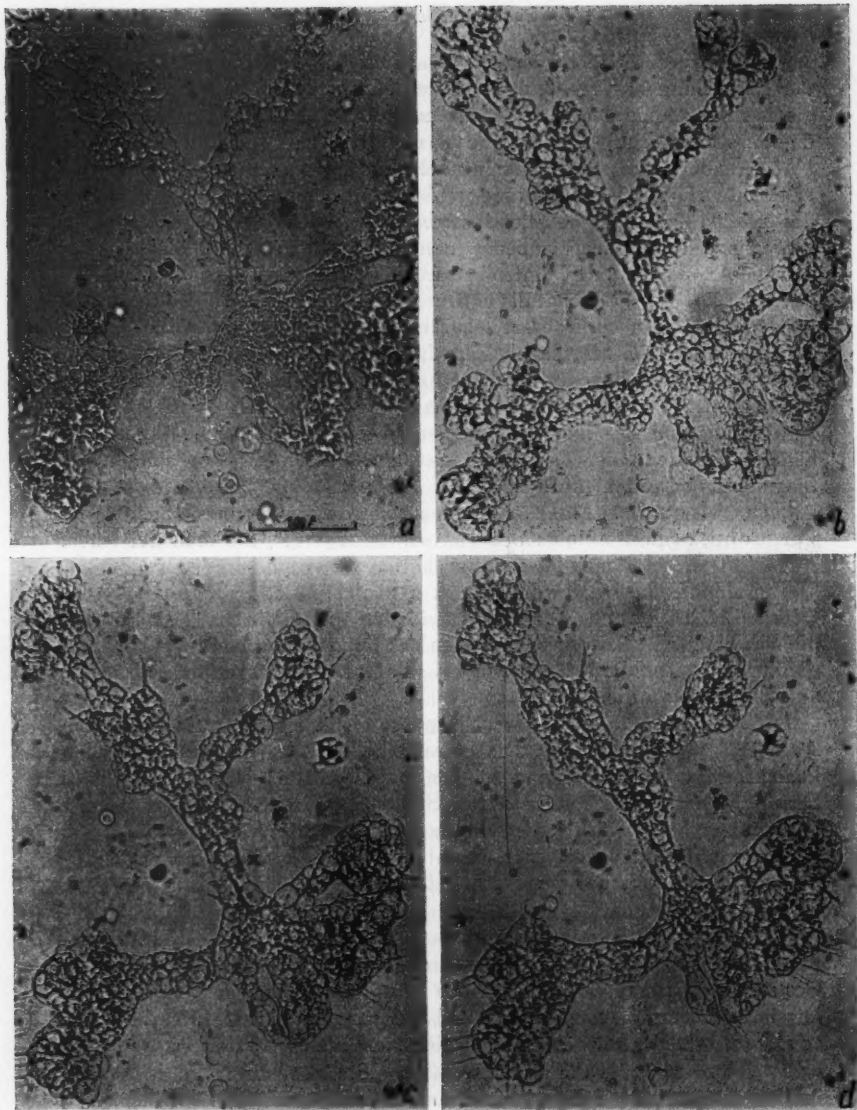
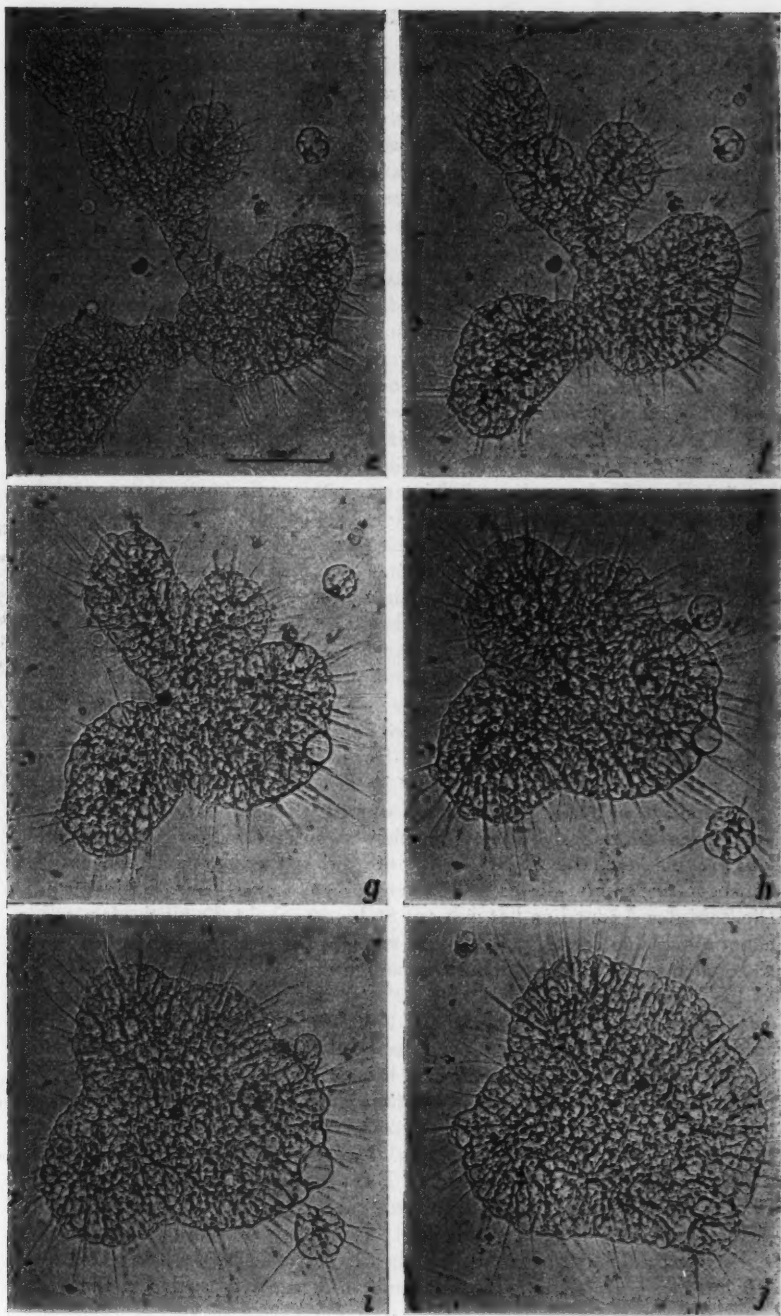


Abb. 9. (Einstellung 67). Starker Druck hat ein *Actinosphaerium* völlig zerquetscht! *a*: Vierfach gelapptes Teilstück unmittelbar nach der Pressung. Innerhalb von 24^m wird aus diesem Restkörper wieder ein abgekugelter, sich normal bewegendes Tier (*b*). In *c* bereits wieder kleine Axopodien. Die vorwiegend aus Flüssigkeitsalveolen bestehenden „Lappen“ „ziehen sich“ auf die mit \times bezeichnete Stelle zurück. Im rechten unteren Lappen zwei kleine Hohlräume mit „Ausführkanälen“ nach außen. In *d* sind diese Hohlräume bereits stark eingengt. *e, i*: Zwei abgekugelte, bei der Pressung abgesprengte kleine Teilstücke nähern sich mit Hilfe ihrer kleinen Axopodien; sie verschmelzen mit dem „Muttertier“. *h*: Plasmalappen fast ganz auf die „Mitte“ zurückgezogen. Viele Axopodien, kontraktile Vakuole. Erstaunlich ist, daß selbst der hier angewandte sehr starke Druck nicht zum



Platzen von ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen geführt hat! Teilstrich = 1 mm.
Zeitangaben im Text.

gangen. Etwa 25 Axopodien sind bis jetzt ausgebildet worden. Die Breite des Verbindungsstieles (X) ist von $15\ \mu$ (a) auf $29\ \mu$ infolge der Zusammenziehung angewachsen; der „Stiel“ setzt sich an der dünnsten Stelle aus zwei Reihen von Flüssigkeitsvakuolen zusammen. Im rechten unteren, breiten Fortsatz geht von dem sehr schmal gewordenen unteren Hohlraum ein schmaler „Kanal“ distad; an der schmalsten Stelle ist er nur $2\ \mu$ breit. Am oberen Hohlraum ist die Sachlage nicht so deutlich.

54^s später ist die größte Längsausdehnung auf $476\ \mu$ verringert (Teilbild d). 51 Axopodien sind jetzt sichtbar. Der schmale „Kanal“ am unteren Hohlraum ist nach außen geöffnet. Auch am oberen Hohlraum scheint eine weniger als $1\ \mu$ breite Verbindung nach außen zu bestehen. Die Beseitigung dieser durch die Pressung verursachten Hohlräume beim Restitutionsvorgang scheint durch diese temporären Verbindungen mit dem Außenmedium leichter vonstatten zu gehen.

Teilbild e (2^m 38^s seit d; 6^m 54^s seit a) läßt eine weitere Konzentrierung der Fortsätze erkennen, so daß die größte Längsausdehnung nur noch $385\ \mu$ beträgt. Etwa 78 Axopodien sind jetzt zu zählen. Es beginnt nunmehr die Phase der langsamen Verlängerung der Axopodien, kenntlich an den vorbereitenden Verbreiterungen der basalen Teile, die einen bandförmigen Eindruck erwecken. Die vier Fortsätze des Restkörpers sind wesentlich kürzer und dicker geworden; sie „ziehen sich“ weiter proximal zusammen. Der „Verbindungsstiel“ ist erheblich breiter geworden.

In Teilbild f (2^m 6^s seit e) beträgt die größte Längsausdehnung nur noch $327\ \mu$ bei einer Breite des Verbindungsstieles von $51\ \mu$. Etwa 88 Axopodien sind jetzt ausgestreckt, die meist noch eine stark verbreiterte Basis aufweisen. Weitere 3^m später (12^m seit a) zeigt Teilbild g, daß der „Verbindungsstiel“ infolge der direkten Berührung der abgekugelten Fortsätze nunmehr verschwunden ist. Das im Wiederaufbau befindliche *Actinosphaerium*, d. h. der größte Rest des ursprünglichen Tieres vor der starken Pressung, besteht jetzt aus den in sich zusammengezogenen vier langen Fortsätzen des Teilbildes a, die sich außerdem stark abgekugelt haben. Rechts nimmt die erste kontraktile Vakuole ihre Tätigkeit auf. Die Zahl der Axopodien hat sich auf 86 bis 90 erhöht. Das sich oben rechts nähernde kleine kugelige Teilstück von $32\ \mu$ Durchmesser hat noch $57\ \mu$ Abstand; es weist einige kleine Axopodien auf.

In Teilbild h (5^m 2^s seit g; 17^m 42^s seit a) sind die Größenverhältnisse des sich restituierenden Restkörpers: $271\ \mu/278\ \mu$. Etwa 91 Axopodien sind ausgesandt. Das kleine obere sowie das größere untere Teilstück ($48\ \mu$) sind infolge ihrer aktiven Beweglichkeit bereits in Berührung mit den Axopodien des großen restituierenden *Actinosphaerium* gekommen. 1^m 6^s später (Teilbild i) ist das kleine obere Teilstück in innigem Kontakt mit dem Ektoplasma. Das größere untere, das etwa sieben relativ sehr lange Axopodien aufweist, hat einen spitzen Fortsatz ausgesandt, der schon die Oberfläche des großen Tieres berührt. Links unten nähert sich ein drittes kleines Teilstück.

Das letzte Teilbild der Einstellung 67, j, wurde 24^m später als a aufgenommen; 5^m 12^s sind seit i vergangen. In dieser Zeit ist das kleine obere

Teilstück völlig verschmolzen, vom größeren ist rechts unten noch ein kleiner stumpfer Fortsatz zu bemerken. Das kleine dritte Teilstück ist ebenfalls fast ganz einbezogen. Die Größe des restituierten *Actinosphaerium* beträgt jetzt $278 \mu/281 \mu$. Die Gesamtabkuglung ist fast ganz durchgeführt; die Ausbildung einer einheitlichen Ektoplasmazone ist im Gange, da jetzt alle vier Fortsätze zentripetal eingezogen worden sind. Die normale scharfe Abgrenzung des Ektoplasma gegen das Entoplasma ist noch nicht deutlich ausgeprägt. Links oben nähern sich ein sehr kleines und ein großes Teilstück, deren Verhalten jedoch nicht weiter kinematographisch aufgezeichnet wurde, die aber vermutlich ebenfalls noch zur Verschmelzung kamen.

Zusammenfassung über die Einstellung 67 (Abb. 9, a—j)

Innerhalb von 24^m nach Aufhören des künstlich gesetzten starken Druckes, der zu einer völligen Zerstörung der normalen Zellgestalt von *Actinosphaerium* führte, wird aus dem bei der Pressung entstandenen, vierfach gelappten größten Teilstück von 518μ maximaler Länge ein nahezu wieder völlig kugeliges Tier von 280μ Durchmesser mit etwa 80 neugebildeten Axopodien; das restituierte Tier zeigt Eigenbewegung mit Ortsverlagerung. Schon $1\frac{1}{2}^m$ nach dem Aufhören des Druckes sind bereits wieder die ersten kleinen Axopodien ausgebildet.

Durch den Druck entstandene kleine Hohlräume werden allmählich zusammengepreßt; zur Erleichterung dieses Vorganges werden mikroskopisch kleine „Kanäle“ nach außen gebildet.

Das gesamte vierlappige Restgebilde zieht sich langsam allseitig „auf sich selbst“ zusammen unter Abrundung der distalen Enden der Fortsätze. Drei bei der Pressung abgetrennte kleine, mit Axopodien versehene und aktiv bewegliche Teilstücke werden einverleibt. 12^m nach Aufhören des Druckes funktioniert die erste kontraktile Vakuole wieder.

Bei Versuchsende, nach 24^m , ist eine scharfe Trennung von Ekto- und Entoplasma noch nicht wieder ausgebildet; die zentral gelegenen Teile des Cytoplasma beginnen gerade ihre fein-granulierte Entoplasmastruktur wiederherzustellen.

Unmittelbar nach der Pressung ist die typische Entoplasmastruktur in dem großen vierlappigen Gebilde nicht zu beobachten; es besteht im wesentlichen aus ungefähr gleich großen, ungemein widerstandsfähigen, mehr oder weniger gegeneinander abgeplatteten Flüssigkeitsvakuolen von ektoplasmatischem Habitus, der etwa über ein Drittel der Versuchszeit beibehalten wird. Erst wenn der Abkuglungsvorgang der distalen Teile der Fortsätze einen gewissen Grad erreicht hat, scheint sich in den zentraleren Teilen der keulenförmigen Fortsätze das Entoplasma allmählich wieder herauszudifferenzieren, ohne jedoch bei Versuchsende den Normalzustand zu erreichen.

Einstellung 67 zeigt erneut die erstaunliche Widerstandsfähigkeit der ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen gegenüber mechanischen Eingriffen. Noch nicht zu entscheiden ist die Frage nach dem Verbleib des feiner strukturierten Entoplasma; ob es als Folge der

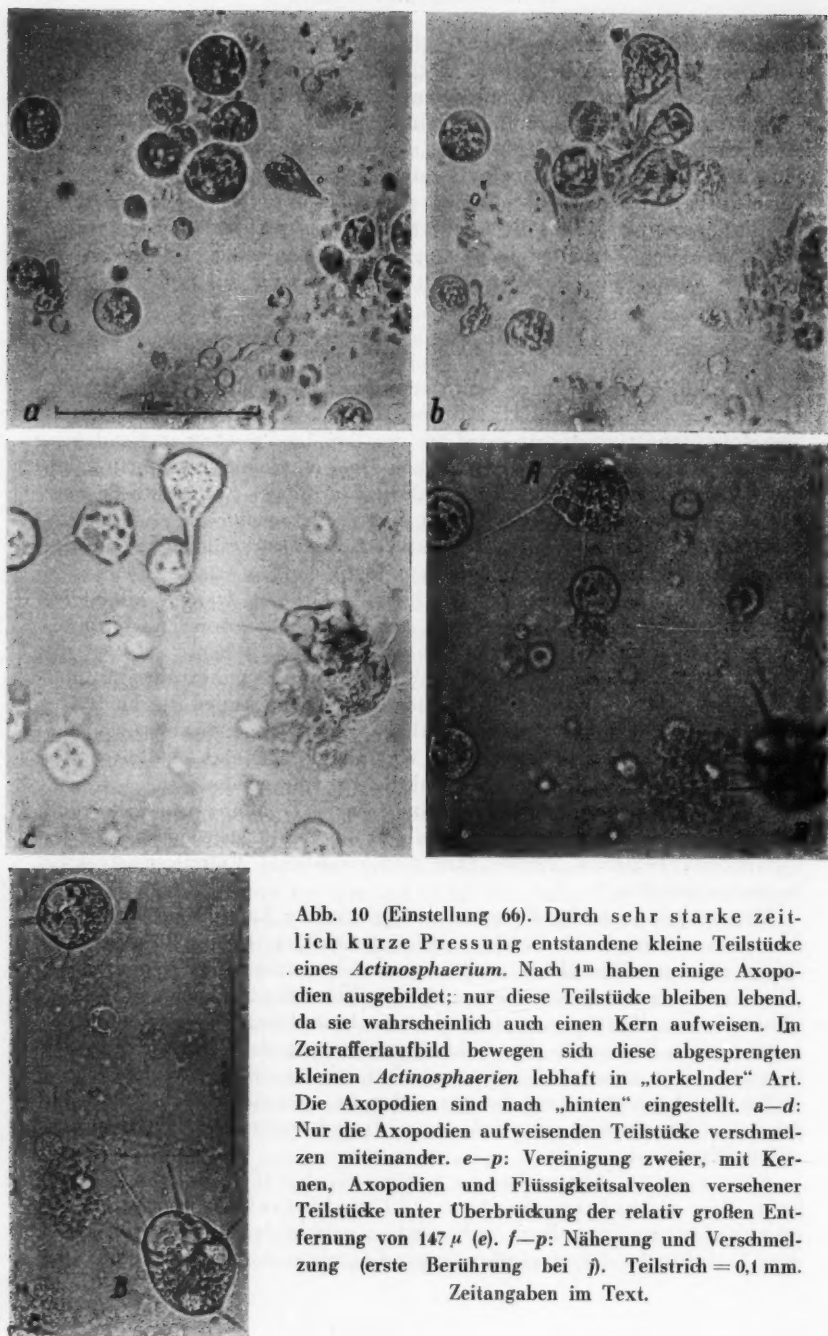
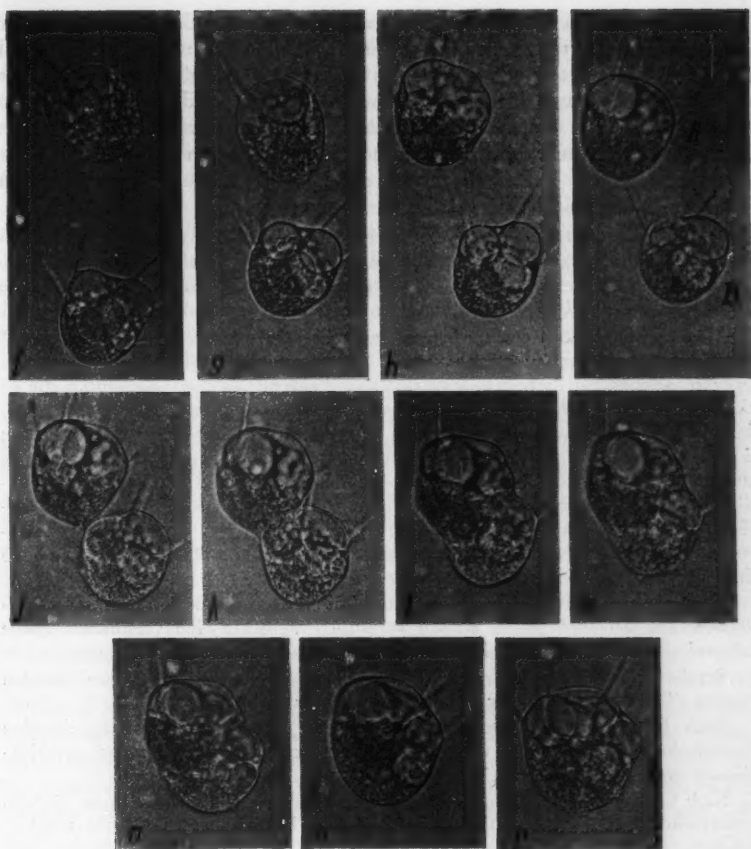


Abb. 10 (Einstellung 66). Durch sehr starke zeitlich kurze Pressung entstandene kleine Teilstücke eines *Actinosphaerium*. Nach 1^m haben einige Axopodien ausgebildet; nur diese Teilstücke bleiben lebend, da sie wahrscheinlich auch einen Kern aufweisen. Im Zeitrafferlaufbild bewegen sich diese abgesprengten kleinen *Actinosphaerien* lebhaft in „torkelnder“ Art. Die Axopodien sind nach „hinten“ eingestellt. a—d: Nur die Axopodien aufweisenden Teilstücke verschmelzen miteinander. e—p: Vereinigung zweier, mit Kernen, Axopodien und Flüssigkeitsalveolen versehener Teilstücke unter Überbrückung der relativ großen Entfernung von 147 μ (e). f—p: Näherung und Verschmelzung (erste Berührung bei j). Teilstrich = 0,1 mm.

Zeitangaben im Text.



Pressung relativ schnell in die grobvakuolisierte Phase übergeht, ist noch unsicher. (Bei einem normalen *Actinosphaerium* von $200\ \mu$ Durchmesser und einer Höhe des Ektoplasma von $40\ \mu$ beträgt das Verhältnis der Volumina von Ekto- und Entoplasma 35:9. Das Volumen des Anteils der Zellkugel, der Entoplasmastruktur aufweist, ist 27,3% des Inhaltes der grobvakuolisierten ektoplastischen, $40\ \mu$ „dicken“ Hohlkugel.

Bei plötzlich angewandtem, sehr heftigem Druck, der nur sehr kurz einwirkt, „zerspritzt“ das *Actinosphaerium* völlig in viele kleine und kleinste Teilstücke.

Einstellung 66 (Abb. 10, a—p) stellt in einigen Teilbildern einen derartigen Pressungsversuch dar. Nach Aufhören des Druckes liegen etwa 16 noch lebensfähige, mehr oder weniger abgerundete Teilstücke im Bildfeld vor. 2 Minuten nach der Druckentlastung setzt die Mikrozeitraffer-Aufnahme ein.

Abb. 10, a zeigt einige noch einigermaßen normale Cytoplasmastruktur aufweisende Teilstücke mit einem Durchmesser, der zwischen 20μ und 34μ schwankt. 30^s später (b) bilden etwa fünf bis sechs Teilstücke zwei bis vier Axopodien aus, wobei ihre Gestalt birnförmig wird. In der Bildmitte liegen noch einige vielleicht vital bleibende Teilstücke mit Axopodien, die infolge der Axopodienbildung ihre Abstände vergrößert haben. Die jetzt noch abgekugelten Teilstücke mit in der Mitte angehäuften Granula und hyaliner Außenschicht sind geschädigt und sterben ab.

Howland (1928) beobachtete das Verhalten von völlig abgetrennten und dann wieder in die Nähe gebrachten Axopodien. Die abgelösten Teile führten langsame „herumirrende“ Bewegungen aus; bei Berührung mit intakten Axopodien erfolgte Einverleibung. Dabei können Plasmanetze ausgebildet werden.

Während der amöboiden Bewegung der Teilstücke wurden in den „Filopodien“ keine Achsenfäden gebildet. Plasmatische Netze traten vor allem dann auf, wenn mehrere Axopodienteilstücke sich vereinigten. Während Axopodienteilstücke, die zu aktiver Bewegung fähig sind, auch mit anderen Tieren verschmelzen können, werden abgestorbene Stücke von Axopodien „verweigert“. Axopodienteilstücke können sich auch einem *Actinosphaerium* nähern, ohne daß eine Verschmelzung zustande kommt. Wenn nach 40–50 Minuten keine Vereinigung erfolgt ist, werden die Teilstücke hyalin; sie zeigen Auflösungserscheinungen. Greef (1867) teilte durch Deckglasdruck ein Tier in 20–30 Teilstücke; diese rundeten sich ab, sandten Pseudopodien aus und sonderten ihr Plasma wieder in „Rinde und Mark“. Teilstücke ohne Kern gehen zugrunde, desgleichen isolierte Kerne.

Nach Gruber (1887) braucht ein kernloses Teilstück nicht notwendig abzuscheiden. Bei *Actinophrys sol* wiesen kernlose Fragmente eine verschieden lange Lebensdauer auf; ohne Kern kommen jedoch keine Neubildungen zustande.

Bereits 1877 zerschnitt Brandt *Actinosphaerien*; innerhalb weniger Stunden wurden die Teilstücke zu einem vollständigen Tier ergänzt.

Nach Brandt (1878) bildet die von großen Vakuolen durchsetzte „hyaline Rindensubstanz“ nach außen einen „verschieden breiten Saum“, dem bei der Neubildung der „Pseudopodien“ eine große Bedeutung zukommt.

Nach Okada (1930) können kleine Bruchstücke von *Actinosphaerium*, die alle wesentlichen Bestandteile enthalten, auf andere Bruchstücke verpflanzt werden; jedoch sollen die kleineren Teile immer nur von den größeren aufgenommen werden, was selbstverständlich ist. Das kleinere Bruchstück wird zu einem Teil der Zellkugel; es verschwindet nicht vollkommen im Plasma des größeren. Es soll sogar etwas von seiner Rindenstruktur einschließlich einiger Axopodien erhalten bleiben.

Nach unseren Versuchen kommen auch gleich große kleine und kleinste Teilstücke von *Actinosphaerium* infolge aktiver Bewegungen zusammen und verschmelzen miteinander. Richtig ist die Beobachtung, daß die „Rindenstruktur“ z. T. erhalten bleibt bei der Einfügung.

Teilbild c (41^s seit b) zeigt, daß nach erfolgter Axopodienbildung die Anhäufung kleiner Teilstücke in der Bildfeldmitte aktiv auseinandergegangen ist, nachdem bereits vorher eine Verschmelzung stattgefunden hat. Bemerkenswerterweise bleiben die völlig abgekugelten kleinen Teilstücke, die keine Axopodien mehr auszubilden vermögen, also offenbar abgestorben sind, von Verschmelzungsvorgängen frei. Es befinden sich noch vier aktiv bewegliche Teilstücke mit je drei bis fünf Axopodien im Bildfeld: zwei links oben und zwei an der rechten Seite, die gerade in

Vereinigung begriffen sind. Teilbild *d* (2^m 13^s seit *c*) läßt erkennen, daß die in *c* links oben gelegenen Teilstücke unterdessen verschmolzen sind (*A*). *B* ist unscharf abgebildet infolge der lebhaften Bewegung während der offenbar immer noch nicht beendeten Verschmelzung. *A* und *B*, deren Bewegungen in den folgenden Teilbildern genauer verfolgt werden sollen, bestehen demnach schon aus je zwei kleinen Teilstücken. Die noch im Bildfeld sichtbaren, vollkommen abgekugelten Teilstücke weisen deutliche Absterbererscheinungen auf; sie werden daher nicht weiter berücksichtigt. Der Abstand von *A* und *B* beträgt 117 μ . *A* hat schätzungsweise neun nach einer Seite gerichtete Axopodien. In Teilbild *e* (9^m 7^s seit *d*; 12^m 51^s seit *a*) haben sich die im Zeitrafferlaufbild sehr beweglichen Teilstücke voneinander entfernt; ihr Abstand beträgt jetzt 143 μ . *A* liegt so, daß nur drei Axopodien sichtbar sind. *B* läßt sieben Axopodien erkennen. Die Gestalt der Teilstücke ist sehr veränderlich.

Das folgende Teilbild *f* (9^m 25^s seit *e*; 22^m 16^s seit *a*) zeigt einen Abstand der Tiere von 56 μ . *A* hat seit *e* an Volumen stark zugenommen; sein größter Durchmesser ist jetzt 53 μ gegenüber 39 μ in Teilbild *e*. Zwei große Flüssigkeitsvakuolen, die sich teilweise überlagern, liegen im Cytoplasma von *A*, und zwar in der Bewegungsrichtung hinten. Die sichtbaren fünf Axopodien weisen sämtlich, untereinander leicht divergierend, nach links oben. Die beiden großen, ovalen Vakuolen liegen im Bereiche der Ansatzstellen der Axopodien, jedoch in einer anderen Ebene. Der Außenkontur des Teilstückes wird durch die beiden Vakuolen leicht vorgewölbt. Im vakuolenfreien Teil von *A* ist das Cytoplasma durch feine Granulationen gekennzeichnet; einige am lebenden Objekt kaum erkennbare mehr oder weniger ovale „Einschlüsse“ fallen auf (Kerne?). Der „Zellkörper“ des Teilstückes *B* ist sehr ähnlich strukturiert; durch zwei große (eine runde und eine ovale) Flüssigkeitsvakuolen wird der Außenkontur an zwei Stellen stark vorgewölbt. Acht Axopodien inserieren auch hier an dem Teil, der die Vakuolen trägt. In der Mitte des Teilstückes erkennt man ein ovales Gebilde (größter Durchmesser: 24 μ , kleinster Durchmesser: 22 μ) mit sehr feiner Granulierung, das wahrscheinlich als Kern angesprochen werden kann. Der größte Durchmesser von *B* mißt 53 μ .

Zu beachten ist die Tatsache, daß bei beiden Teilstücken die Axopodien in bezug auf die Bewegungsrichtung hinten liegen!

In Teilbild *g* (1^m 18^s seit *f*) sind *A* und *B* nur noch 20 μ voneinander entfernt. Die beiden großen Vakuolen von *A* scheinen zu verschmelzen. 4^m 59^s später (*h*) liegt eine Entfernung von 32 μ zwischen *A* und *B*. In *A* sind die beiden großen Flüssigkeitsvakuolen verschmolzen.

Von jetzt ab nähern sich die Teilstücke kontinuierlich bis zur Verschmelzung. In Teilbild *i* (3^m 50^s seit *h*) ist der Abstand 24 μ , auf dem nächsten Teilbild, *j* (1^m 12^s seit *i*), berühren sich die kleinen „Partner“ gerade. In *k* (22^s seit *j*) ist die Verschmelzung eingeleitet. Leider ist Lage und Verbleib des „Kernes“ (vielleicht in der Berührungszone?) nicht mit Sicherheit festzustellen. In Teilbild *l* (43^s seit *k*) vollzieht sich die Vereinigung in breiter Zone. 25^s später, *m*, ist nur noch eine geringe Einbuchtung in der Vereinigungszone zu sehen; der „Kern“ liegt offenbar in der

Mitte. Innerhalb der nächsten 32^s berühren sich die Flüssigkeitsvakuolen der verschmolzenen „Partner“ (*n*). Die Vereinigung ist derart erfolgt, daß die Axopodien beider Teilstücke wieder nach einer Seite (oben rechts) zeigen. In Teilbild *o* (1^m 34^s seit *n*) ist die Verschmelzung abgeschlossen; das neuentstandene „Teilstück-Pseudoeindivuum“ zeigt eine breit-ovale Gestalt. Die Verbreiterung wird durch die dichtgedrängte Lage der vier großen Flüssigkeitsvakuolen an der Peripherie hervorgerufen.

Das letzte Teilbild der Einstellung 66, *p* (3^m 22^s seit *o*, 40^m 31^s seit *a*), zeigt ein ebenso hohes wie breites „Regenerat“, ein „tertiäres Pseudoeindivuum“ oder welche Bezeichnung man wählen mag. Der größte Durchmesser beträgt 62 μ , die größte Breite in der Vakuolengegend weist das gleiche Maß auf. Die Lage des „Kernes“ ist nicht genau bestimmbar.

Zusammenfassung über die Einstellung 66 (Abb. 10, *a–p*)

Auf sehr starke, zeitlich kurze Pressung hin entstehen viele kleine Teilstücke eines *Actinosphaerium*, die sich sofort abkugeln und z. T. schon nach knapp 1 Minute einige Axopodien ausbilden. Nur Teilstücke mit neugebildeten Axopodien, deren Länge oft den Durchmesser des Teilstückes übersteigt, bleiben lebensfähig, oder anders ausgedrückt: vitale Teilstücke sind sofort in der Lage, Axopodien auszusenden.

Derartige Teilstücke vermögen sich auf eine bisher noch nicht geklärte Weise relativ schnell in leicht „torkelnder“ Art (im Zeitrafferlaufbild!) fortzubewegen. Sie stellen dabei ihre wenigen Axopodien divergierend ein. Bemerkenswerterweise liegen die Axopodien bei der Bewegung vorwiegend am physiologischen „Hinterende“ des Teilstückes, wo auch einige große Flüssigkeitsvakuolen peripher angeordnet sind.

Eine derartige kugelige Flüssigkeitsvakuole mißt im Durchschnitt 24 μ , eine Zahl, die gut in der Größenordnung einer normalen ektoplasmatischen Alveole liegt, wenn sie abgekugelt ist (s. Einstellung 65, Abb. 6, *a* und *b*). Es dürfte also kaum ein Zweifel bestehen, daß die kugeligen Alveolen der Teilstücke bei der Pressung isolierte ektoplasmatische Vakuolen des Versuchstieres darstellen. Die lebensfähigen, aktiv beweglichen Teilstücke bestehen also aus drei bis vier ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen, feinkörnigem Entoplasma und wahrscheinlich einem oder zwei Kernen.

Verlauf des Geschehens: Fünf nahe beieinander liegende abgekugelte Teilstücke bilden Axopodien aus und streben sofort aktiv auseinander; 1½^m nach Beginn der Zeitrafferfilm-Aufnahme verschmelzen je zwei dieser vier Teilstücke. Das Verhalten der restlichen beiden, nunmehr größer gewordenen Teilstücke wird in 16 Teilbildern bis zur erfolgten Plasmogamie erläutert. Der Abstand der beiden Teilstücke ändert sich mehrfach infolge aktiver Bewegung der „Partner“. Die größte Entfernung betrug 147 μ ; sie konnte schließlich überbrückt werden. Die erste Berührung erfolgt 33½^m nach Aufnahmebeginn. Nach weiteren 7^m ist die Plasmogamie beendet. Der eine Partner weist im Innern ein ovales kernähnliches Gebilde auf; da diese Beobachtung am lebenden Objekt nicht völlig gesichert erscheint, kann

also zur Zeit die Rolle kernhaltiger und kernloser Teilstücke noch nicht gegeneinander abgewogen werden. Die Vermutung liegt nahe, daß nur kernhaltige Teilstücke lebensfähig bleiben, sich aktiv bewegen, Axopodien ausbilden und Plasmogamien durchführen können.

Die großen, ursprünglich ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen können untereinander verschmelzen.

Das durch den Zeitrafferfilm enthüllte Verhalten vitaler Teilstücke von *Actinosphaerium* legt den Vergleich mit dem von W. Roux an isolierten Amphibienblastomeren aufgestellten Begriff der „Cytotaxis“ nahe, jedoch nur unter der Voraussetzung, daß den kleinen Teilstücken der Wert einer Zelle beigemessen werden darf.

Da *Actinosphaerium eichhorni* wegen seiner zahlreichen Kerne als „polyenergide“ Zelle aufgefaßt wird, ist hier der allgemein übliche Zellbegriff und vor allem der „Individualbegriff“ mit großer Vorsicht anzuwenden. Wie früher (W. Kuhl 1953) bereits angedeutet wurde, ist einem *Actinosphaerium* zunächst nicht anzusehen, ob es nicht gerade kurz vorher durch eine Plasmogamie aus zwei oder mehr Tieren hervorgegangen ist: der „Individualbegriff“ ist völlig unsicher und fließend geworden. Wenn irgendein soeben frisch aus dem natürlichen Biotop herausgefangenes *Actinosphaerium*, dessen Vorgeschichte völlig unbekannt ist, als Einzeller bezeichnet wird, so geschieht dies ohne Feststellung der Größe, der relativen Höhe des Ektoplasma, der Anzahl der Kerne, der gegebenenfalls vorhandenen Korrelation zwischen Tiergröße und Kernzahl usw. Es wird eben jede Phase, ob gerade durch Plasmogamie oder Trennung entstanden, als „einzellig“ und demgemäß stillschweigend als „Individuum“ angesehen. Theoretisch steht also auch nichts im Wege, ein Teilstück, das aktiv beweglich ist und Axopodien auszubilden vermag und Plasmogamien mit anderen Teilstücken gleicher Beschaffenheit und Größe oder auch mit wesentlich größeren durchzuführen in der Lage ist, als „einzellig“ zu bezeichnen, sofern mindestens ein Kern vorhanden ist.

Der Begriff Individuum — Unteilbares — ist gerade bei *Actinosphaerium*, bei dem auch offenbar ohne experimentelle Eingriffe Trennungen stattfinden, völlig ungeeignet; wir benutzten daher die neutraleren Bezeichnungen „primäre“, „sekundäre“, „tertiäre“ usw. „Pseudoindividuen“.

Wie sieht nun ein „Normal-Individuum“ von *Actinosphaerium* aus und wie viele Kerne hat es? Nur mit Hilfe einer sorgfältigst durchgeführten Form- und Korrelationsanalyse im früher angegebenen Sinne (W. Kuhl 1953), wobei auch der jeweilige Ernährungszustand eingehend zu berücksichtigen ist, kann gegebenenfalls ein „Grundtyp“ eliminiert werden, um einen neutralen Ausdruck anzuwenden.

Es sei nochmals daran erinnert, daß Plasmogamien, entgegen der Lehrbuchmeinung, auch ohne das Vorhandensein eines übergroßen Beuteobjektes („Fressgemeinschaft“) wohl ständig vorkommen. Gäbe es ein „Normal-*Actinosphaerium*“, so müßte erst noch seine Variabilität festgestellt werden.

Billigt man demnach dem aktiv beweglichen, Axopodien bildenden, kernhaltigen und zur Plasmogamie fähigen Teilstück den Wert einer Zelle zu, so kann auch W. Roux' Cytotaxis bei der aktiven Näherung und schließlichen Verschmelzung angewandt werden, obwohl die Benutzung dieses Begriffes keinerlei Erklärung über das „Wie“ des Sichfindens gewährt, sondern zunächst lediglich eine prägnantere Benennung für die beobachtete Tatsache der Näherung (über eine Entfernung, die etwa dem vierfachen Durchmesser eines Partners entspricht), Berührung und Vereinigung darbietet.

Es entsteht nun die Frage, ob für die experimentell unbeeinflusste „normale“ Plasmogamie der *Actinosphaerien*, die sich ja ebenfalls unter Überbrückung relativ großer Entfernungen „finden“ und vereinigen, aber auch das Gegenteil, nämlich Trennungen durchführen können, W. Roux' Begriffe „Cytotaxis“ und „Cytarme“ zulässig sind, Begriffe, die seinerzeit für künstlich getrennte Furchungszellen von Amphibienkeimen aufgestellt wurden. Diese Frage ist zu verneinen, da ja bei „normalen“ Pseudoeindividuen von *Actinosphaerium* keineswegs vorher Zellen durch experimentelle Eingriffe aus ihrem natürlichen Zusammenhang gebracht wurden (s. a. W. und G. Kuhl 1937).

Über die Bewegungsweise der kleinen selbständig gewordenen Teilstücke läßt sich zur Zeit noch nicht viel aussagen. Sie verläuft bei den durch Pressung erzeugten „Mikro-*Actinosphaerien*“ nicht genau in der gleichen Weise wie bei „normalen“ Tieren (im Zeitrafferlaufbild), sondern „ruckhafter“ und unter häufigem Richtungswechsel.

IV. Kombinierte Versuche

In dieser Versuchsserie wurde die Wirkung des Zentrifugierens zur „Herstellung“ von „Riesenaggregaten benutzt, dann noch eine starke Pressung angewandt. Vor der Zentrifugierung wurden einige Tiere mit Neutralrot vital gefärbt.

Bemerkungen zur Vitalfärbung mit Neutralrot. Dieser Farbstoff war in starker Veränderung von etwa 1 : 50.000 sehr geeignet zur besseren Sichtbarmachung der Grenzen der bei Plasmogamien verschmolzenen „Pseudoeindividuen“. Neutralrot erwies sich bei *Actinosphaerium* als völlig unschädlich, was durchaus nicht bei jedem Objekt der Fall ist. Manche im allgemeinen für ungiftig angesehene sog. „Vitalfarbstoffe“ wirken schädigend auf das lebendige Protoplasma, sobald das vital angefärbte Zellmaterial unter Zeitraffung gefilmt wird. Infolge der oft viele Stunden währenden Dauer- oder intermittierenden Belichtung des Untersuchungsobjektes treten die offenbar giftigen Eigenschaften erst in Erscheinung. Aus diesem Grunde, der bei *Actinosphaerium* ausnahmsweise einmal nicht vorliegt, verwenden wir bei der Technik der Kinematischen Zellforschung verständlicherweise nur selten Vitalfarbstoffe.

Actinosphaerium „speichert“ Neutralrot aus kaum wahrnehmbar rötlichen Lösungen sehr stark. Der gut rotempfindliche panchromatische Film stellt die vital mit Neutralrot gefärbten Sontentierchen ausreichend dunkler dar als die ungefärbten Tiere. Bei der „Herstellung“ von Riesenaggregaten durch Zentrifugieren

wurden auch einzelne vital gefärbte Tiere mit zentrifugiert. Diese Tiere heben sich für die Dauer von einigen Stunden als dunkle Zonen deutlich im helleren Gruppentier ab. Allmählich wird die scharfe Abgrenzung von gefärbtem Entoplasma gegenüber dem ungefärbten undeutlich. Schließlich erscheint das ganze Riesenaggregat diffus rot — im Zeitrafferlaufbild tiefdunkel — gefärbt. Treten vor dem Diffuswerden der Färbung Trennungen in die üblichen drei „tertiären Pseudoeindividuen“ ein, so zeigt die Färbung sehr deutlich an, daß die Trennung völlig unabhängig von den ursprünglichen Individuengrenzen verläuft, was ja auch bereits oben am ungefärbten Material bewiesen werden konnte (Einstellung 58, Abb. 1, und Einstellung 62, Abb. 3).

Okada (1930) nimmt an, daß das Neutralrot nur an bestimmte kleine Körnchen oder Tröpfchen des Cytoplasma gebunden ist. „Das Wandern der gefärbten Zone von der Peripherie nach dem Zentrum scheint durch die Wanderung der gefärbten kleinen Teilchen zustande zu kommen.“ „Hierfür spricht die Verstärkung der Färbung im Zentrum, die Verkleinerung der gefärbten Zone und der Umstand, daß im Laufe dieser Veränderungen kein Verlust an Protoplasma eintritt.“

Das Zeitrafferlaufbild läßt nichts von einer „Wanderung“ gefärbter kleiner Teilchen erkennen. Die Verstärkung der Neutralrotfärbung scheint völlig homogen im gesamten Zellkörper vor sich zu gehen. Das Entoplasma nimmt die Färbung am intensivsten an, wenigstens scheint es der Fall zu sein; es ist ja auch ohne Anwendung eines Vitalfarbstoffes wesentlich dunkler als das grobvakuolisierte Ektoplasma.

Wir stimmen Okada zu, wenn er sagt: „In jedem Fall und unter jeder Bedingung ist die Mosaikstruktur der verschmolzenen *Actinosphaerien* nicht dauernd, sie besteht nur kurze Zeit, zu Beginn der Verschmelzung.“

Okada (1930) hält die Verschmelzung mit der Oberfläche eines anderen Tieres manchmal für schwierig, „aber wenn der Prozeß einmal begonnen hat, so strömt der Inhalt plötzlich in den Zellkörper hinein. Dabei verengern sich die Bläschen der Rinde an der Verschmelzungsstelle, indem sie dem Druck nachgeben“. Es sind hier „Reinkorporations-Vorgänge“ gemeint, d. h. die Wiedereinverleibung von Teilen von Tieren, z. B. auch von abgetrennten Axopodien. Die wiederaufgenommenen Teile ersetzen nicht direkt den fehlenden Teil des Zellkörpers, sondern sie werden sozusagen als indifferentes Rohmaterial wieder aufgenommen.

Bei natürlichen Plasmogamien, ohne Mitwirkung der Zentrifugalkraft, also wenn z. B. ein kleines mit Neutralrot vital gefärbtes *Actinosphaerium* sich spontan mit einem ungefärbten Tier vereinigt, bleibt der vital gefärbte Bezirk offenbar genau so lange scharf abgegrenzt sichtbar wie beim „Riesenaggregat“.

Aus den Vitalfärbungsversuchen mit Neutralrot geht demnach hervor, daß nach einer Plasmogamie mit einem oder mehreren ungefärbten „Partnern“ die dicht granulierten Entoplasmabezirke der einzelnen Partner mindestens mehrere Stunden getrennt bleiben, obwohl ohne Vitalfärbung der gesamte Entodermbezirk des durch Plasmogamie entstandenen Pseudoeindivium einen durchaus einheitlichen, „zusammengeschmolzenen“ Eindruck erweckt. Notwendig ist zu dieser Feststellung die Vitalfärbung nicht, denn 1. enthüllt das Zeitrafferlaufbild keine entoplasmatische Plasmaströmung, 2. vermitteln die meist charakteristisch gelagerten Nahrungsvakuolen mit ihrem dunklen Inhalt durch das Konstantbleiben ihrer Stellung zueinander die gleiche Erkenntnis, die noch deutlicher in Erscheinung tritt, wenn ein Partner ein besonders dunkles, dichtes

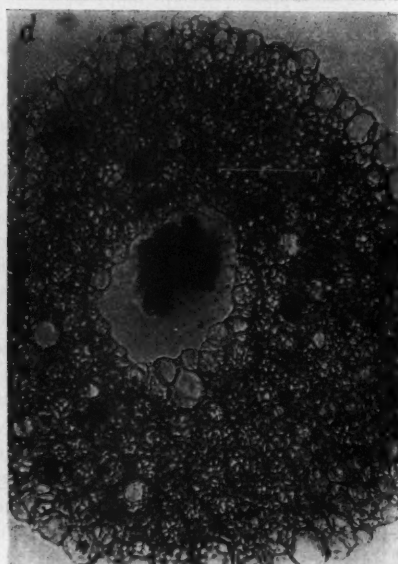
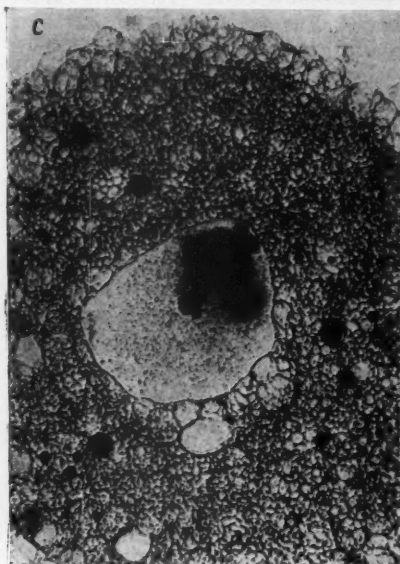
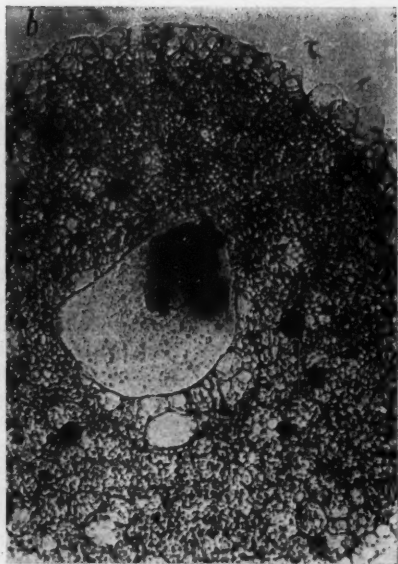
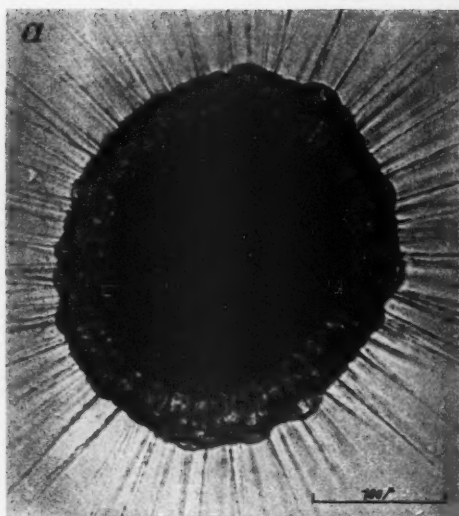
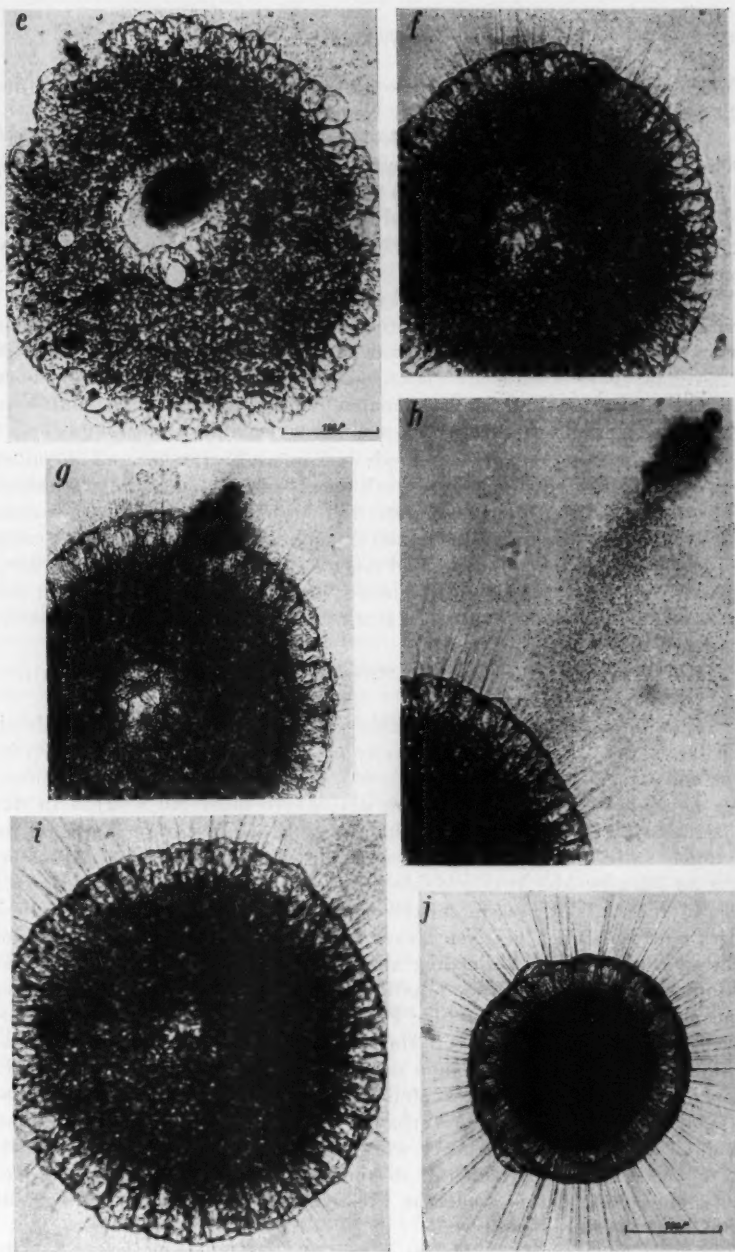


Abb. 11 (Einstellung 77). Kombiniertes Restitutionsversuch: 3% Sld. mit Neutralrot 1: 50.000 vital gefärbt, dreimal gewaschen; das 21^m bei 4400 Umdrehungen je Minute zentrifugiert worden war. Später Pressung. Versuchsobjekt ist zu Aufnahmebeginn 26 1/2 Std. unter dem Deckglas. a: Unmittelbar vor der Pressung, dem 3. Versuchsfaktor. b: Sofort nach der Pressung; große Wundöffnung in der Mitte mit Neutralrotballen (aus Farbstoffvakuolen herausgepreßt). c: Neuordnung ektoplasmatischer Flüssigkeitsalveolen an der Außenschicht Ektoplasma/Wasser. d: Der zentrale Hohlraum wird ebenfalls von einschichtiger Lage früher im Ektoplasma gelegener Alveolen begrenzt („inneres“ Ektoplasma). e: Infolge Wasserzufuhr Kontraktion des Tieres. Zentraler Hohlraum verkleinert; er zeigt regelmäßige Anordnung von ektoplasmatischen Alveolen. Etwa 20 Axopodien



neu ausgebildet, *f, g, h, i*: Das *Actinosphaerium* bewegt sich aktiv unter dem großen herausgepreßten Neutralrotballen fort. *i*: Innerer Hohlraum geschlossen. *j*: Aus einer Kontrollaufnahme 16 Std. nach *i*: Völlig normale Kugelgestalt, lange Axopodien, starke, nunmehr diffuse Neutralrotfärbung, relativ sehr rasche Bewegung im Zeitrafferlaufbild. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Entoplasma aufweist, das in der Schwarzweißphotographie genau den gleichen Eindruck gibt wie ein mit Neutralrot gefärbtes Entoplasma.

Vitale Neutralrotfärbung ist ferner geeignet zur deutlicheren Darstellung der Granula auf den Axopodien und ihrer langsamen Bewegung (Phänomen der Körnchenströmung) im Zeitrafferlaufbild.

Einstellung 77 (Abb. 11 und 12) zeigt einen Versuch über gleichzeitige Einwirkung von Vitalfärbung, Zentrifugierung und Pressung.

Das in Abb. 11, a dargestellte Aggregat wurde tags zuvor $3\frac{1}{2}$ Stunden mit Neutralrot vital gefärbt und dreimal gründlich gewaschen; es liegt ein sehr vitales „Gruppentier“ vor, das durch Zentrifugieren bei 4400 Umdrehungen je Minute (21^m lang) aus einem Material von zwei großen natürlichen Aggregaten, fünf „normalen“ *Actinosphaerien* und fünf Neutralrottieren erhalten wurde (neben anderen Kombinationen).

Das gefilmte Aggregat befindet sich zu Versuchsbeginn 26^h und 36^m unter dem Deckglas. Seine ellipsoide Gestalt verrät seine lebhaft bewegliche. Es sind lange Axopodien ausgebildet mit vielen vital gefärbten Granula. Aus wie vielen primären Pseudoindividuen sich das Aggregat, das einen größten Durchmesser von 282μ und einen kleinsten Durchmesser von 243μ aufweist, bei einer Höhe des Ektoplasma von 35μ , zusammensetzt, läßt sich nicht mehr feststellen, da die Neutralrotfärbung sich über das gesamte Aggregat diffus ausgebreitet hat.

Teilbild a der Abb. 11 wurde unmittelbar vor der Pressung, dem dritten Versuchsfaktor, aufgenommen.

Teilbild b (5^s seit a, also unmittelbar nach der Pressung) zeigt, daß durch den Druck der Durchmesser auf mehr als das Doppelte angestiegen ist (von 282μ auf 602μ !). Es ist ein flaches, ringförmiges Gebilde entstanden. Der Durchmesser der Öffnung in der Mitte mißt $140 \times 195\mu$. In der Öffnung befindet sich ein großer Klumpen Neutralrot. Ob der Farbstoff im Cytoplasma feinstkörnig ausgeschieden war oder ob er in dieser Ansammlung an irgendwelche Mikrogranula gebunden ist, läßt sich an Hand dieser Zeitrafferfilmaufnahme nicht entscheiden. Eigenartig ist auf jeden Fall diese durch den plötzlichen heftigen Druck frei werdende Zusammenballung im zentralen, als schwere Verletzung anzusprechenden Hohlraum. Sofern das Ektoplasma nach dem Druck erhalten ist (im Bilde oben), zeigt es kaum eine geringere Höhe als vor der Pressung. In der flachgedrückten Entoplasma-region liegen etwa zwölf stark gefärbte kleine Vakuolen. Im feingranulierten Entoplasma scheinen zahlreiche Kerne als helle Gebilde durch. Infolge des starken Druckes sind viele ektoplasmatistische Flüssigkeitsvakuolen aus ihrem normalen Verbandsgerüst gerissen und regellos in die dünne Entoplasmaschicht „eingedrückt“ worden. Distal hängt die Rindenschicht (Ektoplasma) nicht mehr überall zusammen. Mehr oder weniger aus dem Verbandsgerüst gelöste ektoplasmatistische Flüssigkeitsalveolen wölben sich distal halbkugelig in das Wasser vor.

In Teilbild c (2^m 38^s seit b) ist die Größe noch unverändert; es wurde noch kein Wasser zugesetzt. Erstaunlich schnell hat sich das Ektoplasma wieder zu einer geschlossenen Schicht von verschiedenen großen Flüssigkeits-

vakuolen „formiert“, teils ein-, teils mehrschichtig. Im Bilde oben besteht z. B. das Ektoplasma aus mehreren Lagen noch durcheinander liegender Alveolen, die sich erst wenig gegeneinander abgeplattet haben. Der zentrale Hohlraum hat sich auf $156 \times 200 \mu$ vergrößert; der durch das Deckglas bedingte Druck hält also noch an.

6^m 22^s später (d) ist der größte Durchmesser auf 537μ verringert, der Hohlraum auf $112 \times 165 \mu$ zurückgegangen; er wird nach dem Wasser zu fast ganz von einer einschichtigen Lage großer Flüssigkeitsvakuolen begrenzt, es hat sich also ein „inneres“ Ektoplasma ausgebildet (vgl. Einstellung 68, Abb. 8, Teilbild c). In der Rindenschicht hat die Neu- bzw. Umordnung der Flüssigkeitsalveolen gute Fortschritte gemacht. Links und rechts oben erkennt man die ersten neu vorgestreckten kleinen Axopodien.

Teilbild e (4^m 33^s) seit d; 13^m 39^s seit a) wurde 65^s nach Wasserzusatz zum Präparat aufgenommen. Das Tier hat sich unmittelbar nach dem Zufließen des Wassers, das eine kleine Hebung des Deckglases zur Folge hatte, auf 434μ Durchmesser „kontrahiert“, genauer ausgedrückt: es ist nach Aufhören des Deckglasdruckes infolge der unzweifelhaft vorhandenen Elastizität der Rindenschicht soweit „zusammengeschnurrt“, wie es der Zustand der Schädigung durch die Pressung zuließ. Der Hohlraum ist dabei auf $70 \times 96 \mu$ verkleinert worden. Er ist nahezu allseitig von einer einschichtigen Lage von Flüssigkeitsvakuolen umgeben. Ungefähr 20 Axopodien sind auf dem optischen Schnitt feststellbar. Das Ektoplasma weist links oben noch eine beträchtliche Störung auf: im übrigen besteht es fast durchweg aus einer einfachen Schicht von Alveolen, die jedoch sowohl nach außen wie in das Entoplasma noch mehr oder weniger halbkugelig vorragen.

Im Verlaufe der nächsten 10^m wird der zentrale Hohlraum weiter stark eingeengt und dabei nahezu kreisförmig. Bemerkenswert ist, daß die „innere“ Auskleidung des Hohlraumes mit Flüssigkeitsvakuolen, ursprünglich ektoplasmatischer Herkunft, an etwa vier Stellen Axopodien den Durchtritt gestattet. Diese Alveolen wurden infolge des angewandten Druckes aus ihrem Verbande gerissen und zur Umgrenzung des einen schweren Schädigung darstellenden Hohlraumes neu angeordnet. Das „Wie“ dieses sehr interessanten Restitutionsvorganges kann zunächst noch nicht klar gestellt werden, auch nicht durch Analyse des Zeitrafferlaufbildes. „Freies“ Entoplasma kann bei *Actinosphaerium* offenbar auf Grund der erblichen Reaktionsnorm nicht direkt an das Außenmedium — Wasser — grenzen. Nach schweren Eingriffen in die normale Zellstruktur wird daher, möglichst schnell, an durch Verletzungen entstandenen „freien“ Grenzen die schützende grobvakuolisierte Ektoplasmastruktur wiederhergestellt, ob das an der Wandung eines innen gelegenen Hohlraumes vor sich geht, wie im vorliegenden Falle, oder an der normalen Außenseite des Tieres, ist gleichgültig.

Ohne Zweifel wird das bereits vorhandene „Alveolen-Material“ weitgehend verwandt und „zweckvoll“ neu angeordnet, wobei sich diese Vakuolen während der Umordnung wieder genau so verhalten wie ganze Zellen! Von großem Interesse ist, daß diese Flüssigkeitsalveolen ebenso-

gut auf einer konvexen wie auch konkaven Oberfläche — außen wie im inneren Hohlraum — vom Cytoplasma angeordnet werden können.

Nach erneutem Wasserzusatz zum Präparat verringert sich der Durchmesser sofort um $35\ \mu$.

Die Farbstoffanhäufung im zentralen Hohlraum war vermutlich vor der Pressung doch in mehreren Vakuolen abgelagert, die infolge der diffusen Färbung (a) des Tieres vor dem Druckexperiment nicht erkannt werden konnten. Durch die Pressung wurden diese Vakuolen aus dem Entoplasma herausgequetscht; der Farbstoffballen gelangte auf diese Weise auf mechanischem Wege in den Hohlraum. Abb. 11, b, c und d lassen diese kleinen, nunmehr dicht gedrängt liegenden „Farbstoffvakuolen“ deutlich erkennen; sie entsprechen in ihrer Größe den noch im Entoplasma verbliebenen tiefdunklen Farbstoffvakuolen.

Der Wasserzusatz bewirkte eine Hebung des Deckglases, wodurch die vielleicht noch bestehende kleine Pressung aufgehoben wurde, denn das Versuchstier zeigt jetzt im Zeitrafferlaufbild Eigenbewegung. Das Tier gleitet nun — im Zeitrafferlaufbild sichtbar — unter dem aus der Öffnung infolge des langsamen Schlusses der zentralen Verletzung herausgedrückten Farbstoffklumpen durch und bewegt sich langsam von ihm fort.

Lägen nur die Teilbilder dieses Vorganges zur Beobachtung vor, so könnte der fälschliche Eindruck hervorgerufen werden, als ob hier eine Art „Defäkation“ abliefe, ähnlich wie in Einstellung 46 (W. Kuhl 1951, Abb. 22, j). Das Zeitrafferlaufbild beweist jedoch einwandfrei, daß der Farbstoffballen nicht durch Ento- und Ektoplasma „durchgeschleust“ wird, sondern daß sich das *Actinosphaerium* unter dem freiliegenden „Ballen“ fortbewegt; die durch die Pressung frei gewordene Neutralrotzusammenballung liegt ja im zentralen Hohlraum in der „Außenwelt“. Vom Beginn der Neutralrotfärbung bis zum Augenblick der Pressung liegen 33 Stunden, ein Zeitraum, der offensichtlich zur „Bindung“ eines großen Teiles des Farbstoffes und zur Einlagerung in Vakuolen ausreichend ist.

Die Teilbilder f, g, h und i stellen die langsame Entfernung des Tieres von dem Farbstoffklumpen infolge aktiver Bewegung dar. Teilbild f wurde $16^m\ 48^s$ nach e aufgenommen ($36^m\ 27^s$ seit a). Der zentrale Hohlraum ist geschlossen; die „inneren“ Flüssigkeitsvakuolen sind bis zur Berührung zusammengedrängt. In Teilbild g ($1^m\ 7^s$ seit f) mißt der größte Durchmesser des Aggregates jetzt $355\ \mu$; das deutlich abgesetzte Ektoplasma ist $46\ \mu$ hoch. Infolge zunehmender Abkuglung erscheint das Tier wesentlich dunkler als im gepreßten Zustande.

Das beschleunigte Laufbild läßt einwandfrei erkennen, daß der Farbstoffballen an Ort und Stelle liegen bleibt. Die Geschwindigkeit der Eigenbewegung des Tieres wurde auf $36\ \mu$ in 1 Minute berechnet.

Teilbild i (36^s seit h; $45^m\ 58^s$ seit a) zeigt die völlige Wiederherstellung der Kugelgestalt des Aggregates, dessen Durchmesser infolge erneuter Deckglassenkung jetzt $406\ \mu$ mißt. Das Ektoplasma ist $42\ \mu$ hoch; die Axopodien sind, bis auf die Länge, wieder normal ausgebildet.

Das letzte Teilbild der Abb. 11, *j* ($15^h 40^m 21^s$ seit *i*; $16^h 26^m 19^s$ seit *a*), wurde einer Kontrollfilmaufnahme nach etwa 16^h Pause entnommen. Abgesehen von der Vitalfärbung macht das Tier einen völlig normalen Eindruck; eine leichte Abplattung zeigt die wieder vorhandene große

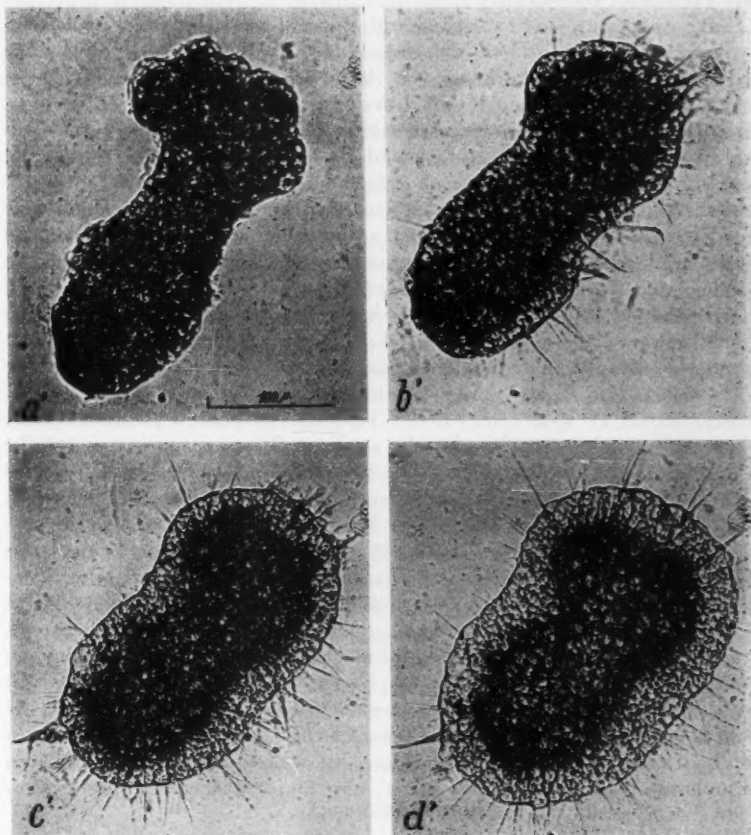


Abb. 12 (Einstellung 77). Teile eines 10^m nach Teilbild *j* der Abb. 11 zerdrückten *Actinosphaerium* des gleichbehandelten Materials. *a'*: Nur Entoplasma ohne distale ektoplasmatische Alveolen. *b'*: Beginn der Differenzierung einer neuen „Rindenschicht“. Breite hervorsprossende neue Axopodien. *c'*: Bereits deutlich abgesetztes Ektoplasma; links unten ein sehr breites Axopodium. *d'*: Fast normale Gestalt. Teilstrich = $0,1\text{ mm}$. Zeitangaben im Text.

aktive Beweglichkeit an. Der größte Durchmesser mißt $236\text{ }\mu$, der kleinste $219\text{ }\mu$; die Ektoplasmahöhe beträgt $32\text{ }\mu$. Man vergleiche *j* mit *a* und vergegenwärtige sich, was dieses große Aggregat durchgemacht hat: 1. Vitalfärbung; 2. Zentrifugierung; 3. Pressung; 4. Restitution des Zell-

körpers und 5. ständig wechselnde Belichtung und Verdunkelung bei der Zeitrafferfilm-Aufnahme! Es sind zwei große kontraktile Vakuolen in Tätigkeit. Die Axopodien sind in normaler Länge und Anzahl vorhanden; die Granula auf den Axopodien sind stark mit Neutralrot gefärbt, desgleichen das Ekto- und Entoplasma.

Mit dieser unwahrscheinlich hohen zellulären Regenerationsleistung, die durch die Einstellung 77 (Abb. 11, a—j) bewiesen wird, ist die Leistungsfähigkeit von *Actinosphaerium* noch keineswegs erschöpft. Aus dem gleichen Material der Einstellung 77 wurde zeitlich etwa 10^m nach Teilbild j ein Aggregat mittlerer Größe, das noch stark mit Neutralrot gefärbt ist, in zwei größere und ein kleineres Teilstück zerdrückt und ein langgestrecktes Aggregat aufgenommen.

Aus Abb. 12 a' (15^m seit j) geht hervor, daß das Teilstück zunächst keine Sonderung in Ekto- und Entoplasma mehr zeigt. 5^m 48^s später (b') sind bereits wieder etwa 30 Axopodien zu zählen. Die neue Sonderung in Rinden- und Marksicht setzt wieder ein. In Teilbild c' (5^m 51^s später) ist die Abrundung des Teilstückes fortgeschritten und die Anzahl der Axopodien erheblich vermehrt; einzelne Axopodien zeigen an ihrer Basis eine bandförmige Verdickung; das bereits für das weitere Ausstrecken bereitgestellte Cytoplasma. Das Ektoplasma setzt sich jetzt deutlich vom dunklen Entoplasma ab. 2^m 53^s später, d', hat das Teilstück bei nahezu gleichbleibender Länge (258 μ in c', 266 μ in d') sehr stark an Breite zugenommen (größte Breite in c': 147 μ , in d': 177 μ). Die neue Ektoplasma-sonderung ist nicht überall gleich hoch; maximal werden 42 μ , im Minimum 25 μ gemessen. Diese Verbreiterung des Teilstückes kann nicht auf eine unbeabsichtigte erneute schwache Pressung zurückgeführt werden, da sie vorwiegend nur in einer Richtung auftritt. Das Plasma weist in a' nahezu Entoplasmastruktur auf; man erkennt keine infolge der Pressung verlagerte einzelne ektoplasmatistische Flüssigkeitsvakuolen, die passiv in das Entoplasma hineingeraten sind. Es ist durchaus möglich, daß bei der Pressung ein größeres Teilstück von reinem Entoplasma zufällig abgequetscht wird. Trifft diese Auffassung zu, so stellen die vier Teilbilder a'—d' die Neudifferenzierung einer „Rindenschicht“ dar, ohne den Einbau von noch erhalten gebliebenen einzelnen Flüssigkeitsvakuolen des früheren Ektoplasma. Das Teilstück hat seit a', also in 14^m 16^s, etwa 75 neue Axopodien ausgesandt.

Zusammenfassung über die Einstellung 77 (Abb. 11 und 12)

Der über 16 Stunden dauernde Versuch gibt einen weiteren eindrucksvollen Beweis der erstaunlich großen Restitutionsfähigkeit von *Actinosphaerium eichhorni*. Vitalfärbung. Zentrifugierung und starke Pressung bis zur flachen Ringform mit einem zentralen Hohlraum bringen das Aggregat nicht zum Absterben. Neutralrot ist für diese *Heliozoenart* wirklich neutral und wirkt auch bei alternierender Belichtung und Verdunkelung während der langfristigen Zeitrafferfilm-Aufnahme nicht giftig. Sehr starke Vitalfärbung mit Neutralrot behindert weder die Plasmogamie während der Zentrifugierung (erleichterte Vereini-

gung von gefärbten mit ungefärbten Tieren), die Axopodienbildung und Bewegungsfähigkeit nach der Pressung noch überhaupt die Restitutionsfähigkeit dieses polyenergidigen Einzellers.

Der durch die Pressung entstandene zentrale Hohlraum wird während der intrazellulären Restitutionsvorgänge unter gleichzeitiger allseitiger Verkleinerung von einer einfachen Schicht von ehemaligen ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen ausgekleidet; es wird hierdurch verhindert, daß freies Entoplasma mit dem umgebenden Wasser in direkter Berührung bleibt. Ektoplasmastruktur ist demnach nicht nur an der konvexen natürlichen Oberfläche von *Actinosphaerium* möglich, sondern auch an durch Verletzung entstandenen konkaven Flächen im Inneren des Tieres. In welchem Umfange an dieser Innenfläche auch eine Neubildung von Flüssigkeitsvakuolen wirksam ist, kann noch nicht entschieden werden. Nach Wasserzusatz zum Präparat kontrahiert sich das entlastete Tier sehr schnell, da der Deckglasdruck vermindert wird. Die Restitution der Oberfläche, d. h. die Neu- und Umordnung der aus der Lage gebrachten ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen geht auch unter leichtem Deckglasdruck ungestört weiter. In den durch experimentellen Eingriff entstandenen zentral gelegenen Hohlraum werden sogar einige kleine Axopodien ausgestreckt. Durch die starke Pressung sind einige „Neutralrotvakuolen“ in Gestalt eines Farbstoffklumpens aus dem Entoplasma in den zentralen Hohlraum gedrückt worden; infolge des langsamen Zuheilens des Hohlraumes wird der Farbstoffballen in das umgebende Wasser hinausgedrückt, und das jetzt wieder aktiv bewegliche Tier entfernt sich langsam von ihm, eine Wolke von kleinsten festen Farbstoffkörnchen (unter 1μ) im Wasser schwebend zurücklassend. Im Laufe des Versuches (über 16 Stunden Dauer) wird demnach der subjektiv diffus im Zellkörper verteilt erscheinende Vitalfarbstoff z. T. wieder ausgeflockt und in „Vakuolen“ gesammelt. Bei Versuchsende ist das restituierte Aggregat immer noch stark gefärbt. Es sieht nach 16^h wieder genau so vital aus wie zu Versuchsbeginn. Ein zu dieser Zeit erneut stark gepreßtes Aggregat des gleichen Materials liefert ein Teilstück, das in ähnlicher Weise den Zellkörper restituiert. Das gefilmte Teilstück bestand vorwiegend aus Entoplasma; es bildete im Verlauf von 15^m eine neue Rindenschicht.

V. Zusammenfassung

1. Es wurde die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf die Cytoplasmastrukturen von *Actinosphaerium* unter Änderung des Zeitmoments mit Hilfe des Mikrozeitrafferfilms untersucht, sowohl im „Ruhezustand“ wie auch bei der Plasmogamie und Trennung. Die Zeitrafferaufnahmen zeigen die Mikrodynamik bei der Zellrestitution, die sich als erstaunlich leistungsfähig erwies.

2. Die Massenzentrifugierung bei 4400 Umdrehungen je Minute und 5–30 Minuten Dauer erleichtert infolge der engen Berührung der Tiere im Zentrifugenröhrchen unter der Druckwirkung der Zentrifugalkraft das Zustandekommen von Plasmogamien; es entstehen „Riesenaggregate“ von 20 und mehr Tieren.

5. Die grobalveoläre Ektoplasmastruktur wird selbst durch halbstündiges Zentrifugieren bei 4400 Umdrehungen je Minute nicht beeinflusst. Die erstaunliche Konstanz der ektoplasmatischen Alveolenwände führt zu verwickelten Auflösungs- und Aufbauerscheinungen bei der Plasmogamie, der Trennung, Nahrungsaufnahme und Defäkation.

4. Durch Zentrifugierung erhaltene „Riesenaggregate“ kugeln sich völlig ab; alte „Pseudoindividualgrenzen“ bleiben oft noch längere Zeit erkennbar. Bald setzt der Trennungsvorgang des instabilen großen Aggregates ein. Die Trennung wird eingeleitet durch Annahme einer Dreiecksgestalt. Das Aggregat „zieht sich“ in drei Zipfel auseinander, und zwar völlig unabhängig von Grenzen der das Aggregat zusammensetzenden „Pseudoindividuen“.

5. Zentrifugierte *Actinosphaerien* bewegen sich (unter Zeitraffung beobachtet) wesentlich schneller als unbeeinflusste Tiere; auch die Trennung läuft schneller ab als bei unbeeinflussten Tieren.

6. Bei der Trennung eines durch Zentrifugierung gewonnenen „Riesenaggregates“, das die typische Dreiecksform angenommen hat und in *A*, *B* und *C* auseinandergehen wird, kann durch neue Plasmogamien — nach der Abtrennung von *A* — der Rest an der weiteren Trennung in *B* und *C* gehemmt werden. In dem unter Zeitraffung aufgenommenen Fall verhinderten drei *Actinosphaerien* eine weitere Aufspaltung des Aggregat-Restes.

7. Etwa 12 Stunden nach einer Massenzentrifugierung treten keine Trennungen mehr auf, es ist ein Gleichgewichtszustand eingetreten.

8. Bei den Pressungsversuchen wurden verschiedene Grade des Druckes bis zur völligen Zerquetschung des *Actinosphaerium* angewandt; außerdem wurde die Dauer der Druckwirkung variiert. Der Mikrozeitrafferfilm zeigt die Dynamik der Restitutionsvorgänge sofort nach Aufhören des Druckes.

9. Durch die Pressung werden die ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen ebenfalls nicht zerstört, sondern unter Abkugelung mehr oder weniger in das Entoplasma hineingedrückt. Nach Aufhören des Druckes werden die Alveolen wieder auf der Kugeloberfläche neu angeordnet.

10. Durch plötzlichen Druck abgesprengte Teilstücke kugeln sich ab und bilden sofort wieder Axopodien aus, sofern sie einen oder mehrere Kerne enthalten. Sie vereinigen sich „aktiv“ mit dem „Muttertier“ oder mit einem größeren Teilstück von diesem. Die hierbei auftretenden dynamischen Vorgänge läßt der Zeitrafferfilm deutlich erkennen. Die Bewegungen sind erheblich verwickelter, als es zunächst den Anschein hat.

11. Bei sehr starkem mechanischem Druck tritt Zerreißung der oberflächlichen Zellregion ein. Bei der Einheilung von losgerissenen Plasmasträngen verhalten sich ektoplasmatische Alveolen in ähnlicher Weise wie aus dem Zusammenhang gelöste Furchungszellen („Cytolisthesis“; W. Roux); sie werden unter Gleitbewegungen neu angeordnet.

12. Nach vollständiger Zerquetschung eines *Actinosphaerium* lag 24^m nach Aufhören des Druckes bereits wieder ein fast völlig ab-

gekugelter Tier mit etwa 80 neugebildeten Axopodien vor, das sich aktiv fortbewegte. Beim Zerquetschen entstehende lappenförmige Plasmastränge „ziehen sich“ nach einem imaginären „Zentrum“ auf sich selbst zusammen unter Abrundung der distalen Enden.

13. Kleine und kleinste Teilstücke vereinigen sich unter Überbrückung relativ großer Entfernungen. Sie müssen ebenfalls zum mindesten einen Kern enthalten, um Axopodien ausbilden zu können und lebensfähig zu bleiben. Eigenartige „stelzende“ Bewegung auf den wenigen starren Axopodien.

14. In kombinierten Zentrifugierungs- und Pressungsversuchen wurde zur Kennzeichnung der alten „Pseudoindividualgrenzen“ Neutralrot-Vitalfärbung angewandt, die hier sehr gut vertragen wurde. Vor der Pressung zentrifugierte *Actinosphaerien* restituieren genau so schnell Kugelform und Ekto- sowie Entoplasmastrukturen wie nur unter Druck gesetzte *Actinosphaerien*.

15. Infolge von sehr starker Dauerpressung soweit abgeplattete Tiere, daß in der Mitte ein zentraler Hohlraum entsteht, „ordnen“ in der Nähe liegende ektoplasmatische Flüssigkeitsalveolen in regelmäßiger Schicht um diesen Hohlraum an („inneres Ektoplasma“). Bei der Heilung der zentralen Öffnung verschwinden diese Alveolen wieder; wahrscheinlich gelangen sie in die neu gebildete Rindenschicht des sich abkugelnden Tieres.

16. Größere nach Zentrifugierung durch starke Pressung abgesprengte Teilstücke, die nur aus Entoplasma bestehen, bilden im Verlaufe von 15^m eine neue alveoläre Ektoplasmaschicht („Rinde“).

Literatur

- Brandt, K., 1877: Über die Fortpflanzung von *Actinosphaerium eichhorni*. Sitz.-Ber. d. Ges. naturf. Freunde. Berlin.
- 1878: Über die Axenfäden der *Heliozoen* und die Bewegungen von *Actinosphaerium*. Sitz.-Ber. d. Ges. naturf. Freunde. Berlin.
- Doflein-Reichenow, 1929: Lehrbuch der Protozoenkunde. 5. Aufl.
- Giersberg, H., 1922: Untersuchungen über den Plasmabau der *Amoeben* im Hinblick auf die Wabentheorie. Arch. f. Entw. Mech. 51.
- Gruber, A., 1887: Über künstliche Teilung bei *Actinosphaerium*. Zoolog. Anz. Nr. 254.
- Howland, R. B., 1928: Grafting and reincorporation in *Actinosphaerium eichhorni*. Biol. Bull. 54.
- Kuhl, W. (unter Mitarbeit von G. Kuhl), 1937: Untersuchungen über das Verhalten künstlich getrennter Furchungszellen und Zellaggregate einiger Amphibienarten mit Hilfe des Zeitrafferfilms (Laufbild- und Teilbildanalyse). Arch. f. Entw. Mech. 156.
- 1949: Vorweisung von zwei Mikrozeitrafferfilmen über *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. Verhdl. d. Deutschen Zoologen. Mainz.
- 1949: Die technischen Grundlagen der Kinematischen Zellforschung. Vorschläge für eine exakte wissenschaftliche Mikrokinematographie. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Kuhl, W. (unter Mitwirkung von G. Kuhl), 1951: Mikrodynamische Untersuchungen an der lebenden Zelle von *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. unter Änderung des Zeitmomentes (Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse). *Protoplasma* 40.
- 1953: Untersuchungen über die Cytodynamik der Plasmogamie und temporären „Plasmabrücken“ bei *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. unter Änderung des Zeitfaktors mittels des Zeitrafferfilms. (Unter Mitarbeit von G. Kuhl). *Protoplasma* 42.
- Okada, J. K., 1930: Transplantationsversuche an Protozoen. *Arch. f. Protistenkunde*. 69.
- Penard, E., 1889: Études sur quelques *Héliozoaires* d'eau douce. *Arch. de Biol.* IX.

Über den Einfluß pharmakologischer Reize auf das Zellbild der Streifenstücke

Von

Margot Wiede

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 10. April 1953)

Die Histophysiologie der Streifenstücke hat bislang wenig Beachtung gefunden. Nach den Zusammenfassungen von Schaffer und Zimmermann ist die Basalstreifung zwar Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen. Soweit sie nicht rein beschreibend sind, sondern sich mit der Dynamik der Zellstrukturen befassen, sind ihre Ergebnisse jedoch nicht ohne Widersprüche. Im folgenden wird über einige Befunde berichtet, die sich bei einer Untersuchung von Ergastoplasma, Chondriom und Golgi-Komplex ergeben haben. Dabei war eine strenge Unterscheidung physiologischer und pharmakologischer Reize in ihrer Auswirkung auf das Zellbild notwendig. Insbesondere war zu klären, welcher Einfluß Pilocarpin, dem klassischen Stimulans der Drüsenphysiologie, bei verschiedener Dosierung zukommt, und in diesem Zusammenhang erhob sich auch die Frage nach einer möglichen toxischen Beeinflussung der Zelle. Methodisch erwiesen sich Befunde mit der Sudanschwarz-Methode von Baker als nützlich. Die Wirkung des Pilocarpins wurde mit der anderer Pharmaka, wie Mintacol und Physostigmin, verglichen, die zu ähnlichen vegetativen Symptomen wie Pilocarpin führen.

I. Material und Methoden

Zur Untersuchung diente die Gl. submandibularis der weißen Maus. Außer normal ernährten Tieren wurden Hungertiere (24 Stunden isoliert, nur Nahrungs-, kein Wasserentzug) als Kontrollen und Hungertiere $\frac{1}{2}$, 1, 2, 6, 13, 24 Stunden, 2 und 4 Tage nach Pilocarpin-, Mintacol- und Physostigmininjektion untersucht. Hungertiere, die erst 2 und 4 Tage p. inj. getötet wurden, erhielten nach Injektion die übliche Ernährung.

Pilocarpin wurde in hoher ($0,3 \text{ cm}^3$ einer 0,2%igen Pilocarpinlösung in Aqu. dest. = 0,6 mg) und niedriger Dosierung ($0,03 \text{ cm}^3$ einer 0,2%igen Pilocarpinlösung in Aqu. dest. = 0,06 mg) benutzt und wie die anderen Pharmaka jeweils Mäusen von 20 bis 25 g Gewicht in die Schwanzvene injiziert. Während stark pilocarpinisierte Tiere zu allen oben angegebenen Zeitpunkten untersucht wurden, geschah dies bei schwach pilocarpinisierten nur $\frac{1}{2}$, 1 und 2 Stunden p. inj.

Die hohe Dosis stellt einen sehr massiven Eingriff dar: Wenige Sekunden nach Injektion zeigten die Versuchstiere starke Krämpfe, heftiges Zittern und Atemnot; sie waren unfähig zu gehen oder zu stehen. Etwas später setzten Speichelsekretion, Harn- und Kotabgang ein. Diese heftige Reaktion dauerte 5–10 Min., danach trat allmähliche Erholung ein. Ein Tier starb kurz nach der Injektion.

Die niedrige Dosis vertrugen die Tiere meist ohne sichtbare Symptome. Bei etwa einem Viertel dieser Mäuse wurde die Sekretion jedoch nach wenigen Sekunden so stark, daß Speichel aus der Mundhöhle tropfte. Hier stand die Intensität der Speichelsekretion der durch große Dosen bewirkten nicht nach, eine Beobachtung, die das histologische Bild insofern bestätigte, als sich bei beiden Dosierungen ein etwa gleiches Verhältnis von stapelnden zu entleerten Endstücken ergab. Ausschließlich solche speichelnde Tiere wurden untersucht.

Mintacol, Diäthyl-*p*-nitrophenylphosphat, ist ein Phosphorsäureester. Wie das Physostigmin gehört es zu den stärksten bisher bekannten Hemmkörpern der Cholinesterase. Für Mäuse beträgt die Dosis tolerata bei i.v.-Applikation des Mintacols 0,1 mg/kg, die Dosis toxica 0,5 mg/kg (Wirth). 0,075 cm³ einer Lösung von 1:6000 Mintacol in Aqu. dest. wurde 20 g schweren Mäusen injiziert. Diese Menge entspricht 0,375 mg/kg.

Physostigmin wirkt etwas toxischer. Die Dosis tolerata soll kleiner als 0,1 mg/kg sein, die Dosis toxica bei 0,2 mg/kg liegen (Wirth). Eine 20-g-Maus erhielt 0,05 cm³ einer Lösung von 0,2 mg Physostigminsulfat in 10 cm³ Aqu. dest. oder 0,05 mg/kg. Höhere Dosen (0,1 mg/kg) wirkten bei den benutzten Tieren letal.

Die nach Injektion beider Pharmaka eintretenden stürmischen Reaktionen bestehen, ähnlich wie nach Pilocarpin, vor allem aus vegetativen Symptomen, wie Unruhe, Schreckhaftigkeit, starkem Zittern, taumelndem Gang, Tränensekretion, Hervortreten der Augen und beschleunigter Atmung. Speichelfluß war weder nach Physostigmin noch nach Mintacol zu beobachten, doch schienen die Mäuse Speichel zu schlucken. Bei Anwendung einer letal wirkenden Dosis Physostigmin floß Speichel aus der Mundhöhle. Alle Symptome klangen nach etwa 10 Min. ab.

Als weiteres, den physiologischen Verhältnissen näher kommendes Reizmittel diente eine 1%ige HCl-Lösung, die normal ernährten Tiere mehrmals tropfenweise in kurzen Abständen in die Mundhöhle geträufelt wurde (Stier). Solche Tiere wurden nach ½ bis 2 Stunden getötet.

Da durch Dekapitation die Submandibularis Verletzungen ausgesetzt ist, erfolgte die Tötung der Tiere nach kurzer, tiefer Äthernarkose. Die entscheidenden Versuche wurden mehrfach mit annähernd gleichem Ergebnis wiederholt.

Färbemethoden: Azan, Sudan III (kolloidale Lösung nach Romeis, versetzt mit 50 mg Na-Laurylsulfat und 5 cm³ Aqu. dest. pro 10 cm³ Lösung¹). Darstellung der Mitochondrien nach Regaud und Benda (nach Romeis). Darstellung des Golgi-Apparates mit der Sudanswarz-Methode nach Baker. Ergastoplasma: Giemsa-Färbung nach Fixierung mit Susa. Ribonucleotide nach Brachet: Methylgrün-Pyronin-Färbung nach Pappenheim-Unna. Behandlung mit kristallisierter Ribonuclease nach Kunitz in einer Konzentration von 0,1 mg/cm³, gelöst in Veronal-Acetat-Puffer von pH 6,88² 30–60 Min. bei 56° C. Kontrolle in Aqu. dest. unter absolut gleichen Bedingungen.

¹ Na-Laurylsulfat zur Verbesserung der Lösungsbedingungen von Sudan III geht auf einen Vorschlag von Herrn Dr. Gaede, Physiolog.-Chem. Institut der Universität Hamburg, zurück.

² Das Fermentpräparat wurde von Herrn Doz. Dr. Th. Bücher (Physiolog.-Chem. Institut der Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Beiden Herren sei an dieser Stelle verbindlichst gedankt.

II. Versuchsergebnisse

Die Beurteilung der Versuche setzt eine genaue Kenntnis des Zellbildes der ungereizten und der unter physiologischen Reizen stehenden Drüse voraus.

Hungertiere:

An der hochprismatischen Streifenstückzelle, deren Kern mehr lumenwärts gelegen ist, hebt sich bei Regaud-Färbung die bis an den basalen Kernpol reichende Basalstreifung heraus. Sie ist durch parallel zur Zellachse verlaufende längere Stäbchen bedingt; aber auch hintereinander aufgereichte kurze Stäbchen und Körnchen tragen zum streifigen Aussehen der Zellbasis bei. Diese Streifen konvergieren häufig gegen den basalen Kernpol. Den einschluffreien Raum zwischen den Streifenbündeln benachbarter Zellen nennt Hiki die „basale streifige Vakuole“. Supranuclear gelegenes, mit EH färbbares feineres Material besteht aus kurzen, dünnen, regellos zerstreuten Stäbchen und Körnchen sowie vielfach einem scharf begrenzten Körnchenfeld, das dem apicalen Kernpol vorgelagert ist oder diesem kappenförmig anliegt. Ein schmaler, dem Lumen angrenzender Cytoplasmasaum ist immer ohne Einschlüsse (Abb. 1).

Erheblich weniger Zellbestandteile färben sich nach Benda an. An der Zellbasis entspricht das Bild des Chondrioms dem bei Regaud-Technik, supranuclear finden sich jedoch nur vereinzelte feine Körnchen oder sehr kurze Stäbchen regellos angeordnet, während Körnchenfelder ganz fehlen. Wie in den Streifenstücken verhält sich das Chondriom nach beiden Methoden in den Ausführungsgängen.

Im Gegensatz zu den Endstückzellen enthalten Streifenstücke und Ausführungsgänge bei der Giemsa-Färbung mit Ausnahme eines blaß bläulichen Hofes um den Zellkern keine basophilen Anteile. Die Zellbasis ist zartrosa getönt und fein gestreift. Es ist also im ausführenden System (= Streifenstücke und Ausführungsgänge) mit dieser Methode eine Vergesellschaftung von basophilem Material und Mitochondrien wie in den stapelnden Endstückzellen, z. B. des Pankreas (Aunap, Ries) oder der Submandibularis, nicht nachweisbar. Zum gleichen Ergebnis kamen Regaud und Mawas bei den „Speichelgangzellen“ der Gl. submandibularis des Menschen. Mit Methylgrün-Pyronin gelingt eine zartrosa Anfärbung des Cytoplasmas der Streifenstücke und Ausführungsgänge, die, wie die starke Rotfärbung des Ergastoplasmas in den zugehörigen Endstücken, nach Einwirkung von Ribonuclease verschwindet. Streifenstücke und Ausführungsgänge zeigen dann eine basale farblose Streifung. Sollte also die

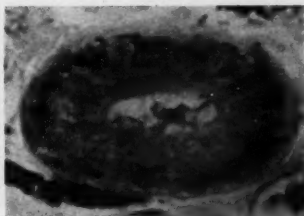


Abb. 1. Gl. submandib., Maus; Hungertier; Streifenstück; Färbung der Mitochondrien nach Regaud. Oben links: supranucleare Körnchenfelder und einschluffreier Cytoplasmasaum besonders deutlich.

Abb. 1—4 in gleichem Maßstab.

schwache Farbreaktion des ausführenden Systems auf Anwesenheit von Ribonucleotiden beruhen, so sind diese erheblich geringer als in den Endstücken vorhanden.

Eine helle Streifung ist in dem diffus graublau getönten Cytoplasma an der Basis der Streifenstückzelle auch bei Sudanschwarz-Technik nach Baker auszumachen. Dieses Plasma färbt sich, wie auch bei künstlich gereizten Tieren, etwas stärker als die heller erscheinenden apicalen Bezirke. Eine Anzahl von Streifenstückzellen zeigt, vor allem apical, ungefärbte Sekretgranula. Schwarz gefärbtes Substrat, in Form von Körnchen und Vakuolen, ist in der Mehrzahl der Zellen nicht, nur in wenigen Zellen vereinzelt, sehr fein und häufiger infra- als supranuclear nachweisbar (Abb. 2). Das Sudanschwarz-Bild in den Ausführungsgängen entspricht hier,

wie in allen anderen Funktionsstadien, dem in den Streifenstücken des gleichen Präparates.

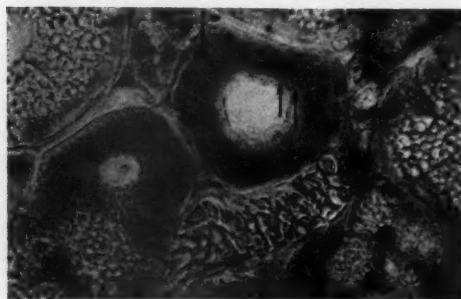


Abb. 2. Gl. submandib., Maus; Sudanschwarz-Fbg. nach Baker. In der Mitte zwei Streifenstücke, daneben stapelnde und entleerte Endstücke. In einem Streifenstück vereinzelt sudanophile Körnchen infranuclear (Pfeil) und supranuclear (Doppelpfeil).

Normaltiere:

Hier erscheint in den Streifenstücken mit Sudanschwarz gefärbtes Material reichlicher als bei der Hungermaus. Wenn es sich auch in der Mehrzahl der Zellen nur vereinzelt in Form feinsten schwarzblauer Körnchen vorzugsweise an der Zellbasis findet, treten in wenigen, meist zu mehreren zusammenliegenden Zellen aber auch voluminösere Körnchen oder kleinere

Vakuolen überall im Cytoplasma auf. Dort, wo die supranucleare Zone genügend breit ist, sind kleine, schwarz gefärbte Körnchengruppen, scharf begrenzt, dem apicalen Kernpol vorgelagert. Sie könnten ihrer Lage nach dem Golgi-Apparat entsprechen. Da sich diese Strukturen mit den nach Regaud darstellbaren supranuclearen Körnchenfeldern decken, dürften also bei der Regaud-Färbung Teile des Golgi-Apparates in Erscheinung treten, wie es auch für die Benda-Färbung bekannt ist (Worley, Gatenby).

An Sudan III-Präparaten ist die stärkere diffuse Färbbarkeit der Basis von Streifenstück- und Ausführungsgangzellen gegenüber den apicalen Zellabschnitten evident. Hier, und genau so bei der Baker-Methode, zeigt also die Zellbasis eine besondere Affinität zu Fettfarbstoffen. Eine diffuse Sudanfärbung von Drüsenzellen und Speicheldrüsenepithelien der menschlichen Submandibularis gibt Yamaguchi an. Di-

stinkte Körnchen sind bei Sudan III-Färbung in diesem Stadium nicht erkennbar.

HCl-Tiere:

HCl-Einwirkung beeinflusst die ruhende Drüse weniger als irgendein anderes der angewandten Reizmittel. Das Verhältnis von stapelnden zu leeren Endstücken erscheint in einigen Drüsen, verglichen mit normalen, nicht verschoben, andere zeigen sich $\frac{1}{2}$ Stunde nach Behandlung mäßig entleert. Auffällig ist aber zu diesem Zeitpunkt die Sekretfülle in den Lichtungen des ausführenden Systems und der Endstücke. Dieses Sekret erscheint arm an ungefärbtem Sekretgranula, färbt sich nach Regaud und enthält häufig mit Carmalaun färbbare Tropfen bis zu Zellkerngröße.

In Streifenstücken wie Ausführungsgängen unterscheidet sich das Bild des Chondrioms bei Regaud-Färbung nicht deutlich von dem nach Pilocarpin. Es wird dort beschrieben.

Mit Sudanschwarz färbbares Substrat findet sich in Form allerfeinster Körnchen vereinzelt supranuclear und basal in Streifenstücken und Ausführungsgängen. Die Befunde $\frac{1}{2}$ oder 2 Stunden p. inj. zeigen untereinander keine wesentlichen Abweichungen, auch keine auffälligen gegenüber normalen Tieren. Die Anwendung eines oder mehrerer Tropfen HCl in kurzen Zeitabständen führt zu gleichen Bildern.

Pilocarpin-Tiere:

Die Beurteilung von Zellbildern nach pharmakologischer Reizung erfordert stets die Durchmusterung eines umfassenden Materials, da entsprechend der Heterosynchronie der zugehörigen Endstücke innerhalb eines einzigen Schnittes verschiedenartige Bilder an Streifenstücken auftreten können.

a) Pilocarpin in hoher Dosierung führt zu verminderter Epithelhöhe des ausführenden Systems, die vor allem den Bereich der supranuclearen Zone einschränkt, und einer größeren Kerndichte, wahrscheinlich infolge Breitenabnahme der Zellen.

Die Veränderungen des Chondrioms nach Pilocarpin bei Regaud- und Benda-Färbung zeigen sich in einem Schwund der basalen Streifung sowie einer Vergrößerung und Zerstreuung mitochondraler Elemente. Schon $\frac{1}{2}$ Stunde nach Pilocarpininjektion hat die Zahl der stäbchenförmigen Mitochondrien an der Zellbasis der Streifenstücke abgenommen. An ihrer Stelle finden sich zunehmend färbbare Körner und sehr kurze Stäbchen, die auf Grund ihrer linearen Anordnung noch als Streifen imponieren können oder aber so ungeordnet liegen, daß die basale Streifung verlorengeht. Die basal und die supranuclear gelegenen Elemente sind gegenüber dem Hungertier vergrößert, also voluminöser. Diese Umwandlung ist jedoch keine allgemeine. Es finden sich vielmehr weite Strecken des ausführenden Systems mit dem für das Hungertier charakteristischen Zustand. Die beschriebene Umwandlung des Chondrioms schreitet weiter fort und erreicht 1 bis 2 Stunden p. inj. ihren Höhepunkt. 6 Stunden p. inj. haben

die Mitochondrien wieder an Volumen abgenommen, bestehen jedoch nur aus Körnchen und recht kurzen Stäbchen und zeigen an der Basis keine Neigung zu radiärer Anordnung.

Der Ribonucleotidgehalt der Streifenstücke und Ausführungsgänge wird durch starke Pilocarpinisierung nicht sichtbar verändert.

Eine sehr starke Beeinflussung des Zellbildes nach hohen Pilocarpin-gaben ergeben die Befunde nach Sudanschwarz-Färbung. Versuchsreihen, in welchen der Zeitpunkt der Tötung nach Anwendung des Pharmakons variiert wurde, lassen eine Vervielfachung der unter physiologischen Verhältnissen nur vereinzelt auftretenden, blauschwarzen, körnigen oder vakuoligen Körper bereits $\frac{1}{2}$ Stunde p.inj. erkennen, während

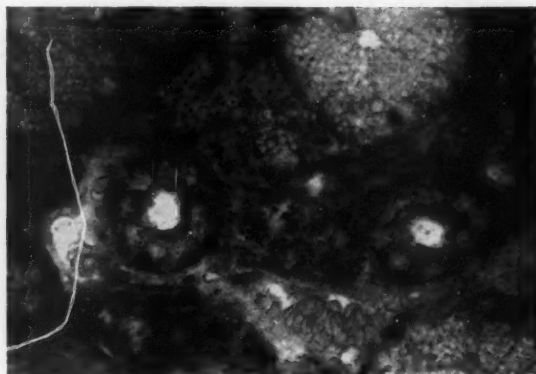


Abb. 3. Gl. submandib., Maus; 2 Stunden nach hoher Pilocarpindosis; Sudanschwarz-Fbg. nach Baker. Zwei Streifenstücke quer getroffen, daneben stapelnde und entleerte Endstücke; massige Anhäufung sudanophiler Granula und Vakuolen im Gebiet der Basalstreifung, para- und supranuclear weniger zahlreich.

ihre Volumenzunahme erst 1 Stunde p.inj. deutlich wird. Körner und Vakuolen erreichen das Maximum ihrer Größe 2 Stunden p.inj. und können bis Zellkerngröße anwachsen, das Maximum an Zahl 2–6 Stunden p.inj. Darauf folgt fortschreitend eine Verminderung von Körnchenzahl und -volumen. 4 Tg. p.inj. übertrifft die Menge der Baker-positiven Substanz die beim Normaltier vorhandene nur mehr um wenig. Die Hauptmasse des sudanophilen Substrates ist in den Streifenstücken und Ausführungsgängen $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 6 Stunden p.inj. stets basal gelagert und manchmal in Reihen parallel zur Zellachse orientiert. Seine Anhäufung bedingt eine massive körnige Schwärzung der Zellbasis (Abb. 3). Es findet sich jedoch nicht ausschließlich in diesem Bereich, sondern kommt auch para- und supranuclear und sogar im Lumen in Form vereinzelter Körnchen und Vakuolen vor. Bei günstiger Schnittrichtung sind dem lumen-seitigen Kernpol regelmäßig mehrere zusammengeballte, schwarze, körnige

oder vakuolige Körper vorgelagert, also Gebilde, die dem Golgi-Apparat entsprechen dürften (Abb. 3).

Spätere Stadien, z. B. 13 Stunden p. inj., zeigen ein Abklingen der Reizwirkung. Sudanophiles Substrat liegt, an Zahl und Größe vermindert, zwar immer noch bevorzugt basal, kommt aber jetzt häufiger als früher in der supranuclearen Zone der Streifenstücke und vor allem zahlreich in deren Lumen vor. Ähnliche Befunde in den Zellen der Ausführungsgänge sowie Bilder sekretbeladener Endstücke, die basal keine schwarz gefärbten Körnchen und Vakuolen, diese aber zwischen den Sekretgranula im Zellapex aufweisen, lassen vermuten, daß diese Körper in der Zelle von basal nach apical wandern, um dann in die Lichtung ausgestoßen zu werden. Der Ausstoßungsprozeß, besonders stark 13 Stunden p. inj., 24 Stunden p. inj. bereits nachlassend, erscheint 48 Stunden p. inj. im wesentlichen beendet (Abb. 4).

Nach starker Pilocarpinisierung lassen sich die mit Sudanschwarz färbbaren Körnchen 1 Stunde p. inj. auch mit Sudan III darstellen. Doch bleibt die Distinktheit der Färbung weit hinter der mit der Baker-Methode erzielten zurück.

Bemerkenswert erscheint, daß der Höhepunkt der Extrusion von Sekretgranula in den Endstücken nach großen wie nach kleinen Pilocarpindosen $\frac{1}{2}$ Stunde p. inj. erreicht wird. Vergleiche zeigen, daß der schwächere Reiz einen umfassenderen Sekretausstoß bewirken kann, denn es stehen Bildern einer Drüse ohne stapelnde Endstücke nach kleinen Dosen die von Drüsen mit vorwiegend leeren Endstücken nach großen gegenüber. Allerdings kann bei der Mehrzahl der Tiere $\frac{1}{2}$ Stunde nach geringer Pilocarpinmenge keine völlige Sekretentleerung nachgewiesen werden. Hier zeigt sich im histologischen Bild bei beiden Dosierungen etwa der gleiche Entleerungseffekt.

b) Das Vorkommen sudanophilen Materials nach geringer Pilocarpindosis hält sich in niederen Grenzen. $\frac{1}{4}$, 1 und 2 Stunden p. inj. differiert der Gehalt an schwarz gefärbtem Substrat nicht wesentlich. Eine $\frac{1}{4}$ Stunde p. inj. entnommene Drüse weist supranuclear und basal an den Streifenstücken wenige Baker-positive Körnchen und Vakuolen auf, supranuclear in regelmäßiger Lagerung vor dem apicalen Kernpol. Zahl, Größe und Verteilung dieses Materials entsprechen etwa dem Bild bei einer Normal- oder Hungerm Maus. In leeren Endstücken ist es zahlreicher als in den Sekretrohren, in stapelnden kommt es 1 und 2 Stunden p. inj. zwischen Sekretgranula in Form von sudanophilen Vakuolen vor.

Die Mitochondrien verhalten sich nach Regaud ähnlich wie bei hoher Pilocarpindosis.

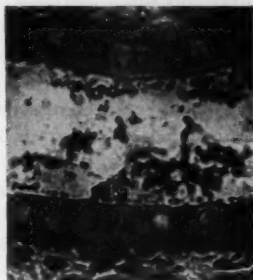


Abb. 4. Gl. submandib., Maus; 13 Stunden nach hoher Pilocarpindosis; Sudanschwarz-Fbg. nach Baker. Ausschnitt aus einem großen Ausführungsgang; intrazellulär nur noch vereinzelte, in der Lichtung, zum Teil auch an der Epitheloberfläche, zahlreiche sudanophile Granula.

Bei stark pilocarpinisierten Hungertieren treten in Leberparenchym- und Hauptstückzellen der Niere Baker-positive Körnchen und Vakuolen auf, deren Menge ebenfalls vom Zeitpunkt der Injektion abhängt und die nach Form und Größe, bei der Niere auch in ihrer Lage, ganz den in den Streifenstückzellen beschriebenen entsprechen und wie diese nach mehreren Stunden aus der Zelle verschwinden. $\frac{1}{2}$ Stunde nach kleiner Pilocarpingabe finden sich jedoch gegenüber dem Normaltier keine wesentlichen Unterschiede.

Mintacol- und Physostigmin-Tiere:

Wie nach hoher Pilocarpindosis treten auch hier, jedoch ohne daß sich die Drüse wesentlich entleerte, eine Anzahl schwarz gefärbter Körnchen und Vakuolen auf, die sich nach Form, Größe und Verteilung nicht von den Befunden nach Pilocarpin unterscheiden.

Die Menge des sudanophilen Substrates und die Art und Weise ihres zeitlichen Auftretens weichen bei Pilocarpin-, Physostigmin- und Mintacol-Versuchen voneinander ab. Bei der Beurteilung dieser Unterschiede ist zu beachten, daß die Dosierung der Pharmaka zwar in allen Fällen nur wenig unterhalb der Dosis letalis lag und zu ähnlichen, stark ausgeprägten Symptomen führte, ihre spezifische Wirkung auf die Gl. submandibularis aber nicht ohne weiteres vergleichbar ist. Trotzdem ist der Wirkung dieser Stoffe eine starke Vermehrung sudanophilen Materials gemein, die bei Mintacol $\frac{1}{2}$ Stunde p. inj., bei Physostigmin und Pilocarpin 2 Stunden p. inj. maximal hervortritt. Physostigmin und Mintacol bewirken einen rascheren Anstieg im Auftreten des Baker-positiven Substrates und eine schnellere Rückkehr zu den Ausgangsverhältnissen.

Schließlich ist noch ein eigentümlicher Befund hervorzuheben, der am stärksten bei einer Drüse 6 Stunden nach Mintacolinjektion auffiel, sich aber auch stärker als bei unbehandelten Tieren zu anderen Zeitpunkten nach der Injektion hochdosierter pharmakologischer Reizmittel zeigte. Es ist die Neigung der Streifenstückzelle, sich im fixierten Schnittpräparat an der Basis von ihrer Unterlage zu lösen, so daß an dieser Stelle ein mehr oder weniger breiter Spaltraum entsteht (Iwasaki). Daß Streifenstückquerschnitte in Sudanschwarz-Präparaten so häufig herausgelöst sind, ist wohl auch hierauf zurückzuführen.

III. Diskussion

Nach pharmakologischer Reizung treten im Bild der Streifenstückzelle folgende Veränderungen auf:

1. Der hervorstechendste Ausdruck am Chondriom ablaufender Veränderungen ist der Schwund der Basalstreifung nach Regaud- und Benda-Färbung (Takagi, Mühlethaler). Er scheint bedingt durch den Zerfall parallel zur Zellachse angeordneter stäbchenförmiger Mitochondrien in körnige Bestandteile, die sich überall im Cytoplasma, mit Ausnahme eines schmalen, am Lumen gelegenen Saumes (Schaffer, Zimmermann, Moloy und Smith, Rawlinson, Iwasaki) verteilen und

bei gleicher Methodik voluminöser als die granulär zerfallenen Mitochondrien beim Hungertier erscheinen. Diese Phänomene treten nach hohen wie nach niedrigen Pilocarpindosen und nach HCl-Anwendung auf.

2. Der beim Hungertier im Vergleich zu Endstückzellen auffallend geringe Bestand an Ribonucleotiden in Zellen der Streifenstücke und Ausführungsgänge bleibt, soweit die Empfindlichkeit der angewandten Methoden eine Aussage gestattet, durch Pilocarpin unbeeinflusst.

3. Nach Anwendung hoher Pilocarpin-, Mintacol- und Physostigmin-dosen läßt sich eine erhebliche Volumenzunahme und Vervielfachung mit Sudanschwarz färbbarer Einschlüsse feststellen. Wird, im Hinblick auf die mit anderen Methoden nachgewiesene supranucleare Lokalisation des Golgi-Apparates (Zimmermann, Iwasaki, Järvi), das supranuclear gelegene, scharf begrenzte, an Hungertieren und nach pharmakologischer Reizung in gleicher Weise mit Sudanschwarz darstellbare Körnerfeld ebenfalls als Golgi-Apparat gedeutet, so unterliegt dieses Zellorganell in seinem Erscheinungsbild auch nach Pilocarpin-, Mintacol- und Physostigmingaben keinen nachweisbaren funktionellen Schwankungen. Die auffällige Veränderung des Zellbildes nach Anwendung dieser Stoffe in hoher Konzentration ist daher wohl auf das Auftreten von Fett- oder Lipoideinschlüssen zurückzuführen, die von Golgi-Körpern der Form und Färbbarkeit nach nicht, wohl aber nach Lage und Größe unterscheidbar sind, dem sogenannten Golgi-Apparat aber nicht zugeordnet werden dürfen. Für diese Gebilde konnte gezeigt werden, daß sie etwa 2 Stunden nach hoher Pilocarpindosis das Maximum an Größe, 2–6 Stunden das an Zahl erreichen und im Verlauf von 2 Tg. ganz oder fast ganz aus der Zelle verschwinden. In den ersten Stunden nach der Injektion treten sie vorzugsweise basal auf, später erscheinen sie auch reichlich im apicalen Zellabschnitt und noch später sehr zahlreich im Lumen des ausführenden Systems. Nach Anwendung von niedrigen Pilocarpindosen und 1% HCl unterscheiden sich die Befunde nicht wesentlich von solchen bei hungernen und normalen Tieren, bei denen nur vereinzelte feinste Körnchen infranuclear vorkommen.

Eine erschöpfende Deutung dieser Zellveränderungen ist schwierig, weil Angriffsorte und Wirkungsmechanismen der hier benutzten Reizmittel nicht genügend bekannt sind.

1. Die Veränderungen des Chondrioms und ihre Bedeutung

Bräm konnte an in vitro gezüchteten Osteoblasten zeigen, daß toxische Einwirkungen (Nikotin, Colchicin, Arsenik, Trypaflavin und Nitrogen Mustard) Veränderungen des Chondrioms hervorrufen, die denen in der Streifenstückzelle nach Pilocarpin in manchem ähnlich sind. Sie lassen zumindest für höhere Pilocarpin-, Mintacol- und Physostigmindosen auch einen ähnlichen Entstehungsmechanismus annehmen. Es wäre denkbar, daß die angewandten Pharmaka am Mitochondrion selbst angreifen, d. h. an diesen irgendwie zu Strukturschädigungen führen. Viel wahrscheinlicher sind Zerfall und Vergrößerung der Mitochondrien darauf zurückzuführen,

daß durch Einwirkung der Reizmittel ein gesteigerter Zellstoffwechsel ausgelöst wird. Er könnte mit der Eliminierung des Pharmakons, falls dieses in die Zelle eingedrungen ist, oder der von Abbauprodukten im Zusammenhang stehen, die als Folge seiner toxischen Auswirkung entstehen mögen. Zweifellos ist bei einer Stoffwechselsteigerung in der Zelle die intensive Mitwirkung der in den Mitochondrien lokalisierten Enzyme der biologischen Oxydation für die Energielieferung notwendig, und der körnige Zerfall des Chondrioms könnte der Ausdruck einer Oberflächenvergrößerung sein, die günstigere Austauschbedingungen zwischen Cytoplasma und Zellorganell bietet. Ebenso könnte die Zerstreuung der Mitochondrienfragmente in die supranuclearen Zellbezirke durch Eigenbewegung mit der Notwendigkeit einer gesteigerten Energielieferung in diesen Zellgebieten zusammenhängen (Zeiger).

Wenn die hier nachgewiesene Volumenzunahme der Mitochondrien ein Fixierungsäquivalent für eine vitale Schwellung dieser osmotisch äußerst labilen Zellorganelle (Zollinger) ist, müßte sie nach den Versuchen von Harman als Ausdruck erhöhter respiratorischer Aktivität gewertet werden. Sie scheint zumindest für bestimmte Anteile des Chondrioms reversibel zu sein, denn 6 Stunden nach hohen Pilocarpingaben kommt es im Zusammenhang mit der fortschreitenden Restitution des normalen Zellbildes wieder zu einer Volumenabnahme der Mitochondrien. Damit soll nicht bestritten werden, daß es in späteren Phasen auch zu einem partiellen Abbau von Mitochondrien oder Mitochondrienanteilen kommt (Ma, Rawlinson, Junqueira).

Einige Angaben der Literatur stützen diese Annahmen: So sind für Roberts die Formveränderungen der Mitochondrien Ausdruck einer Änderung des normalen Zellstoffwechsels. Auch bei Asphyxie kommt es in den verschiedensten Zellen zu einem körnigen Zerfall (Miller). Die zahlenmäßige Abnahme der Mitochondrien nach verlängertem Fasten in Pankreaszellen (Ma) und bei Atrophie der Drüsen- und Ausführungsgangzellen 15–50 Tg. nach Unterbindung der Ausführungsgänge der Submandibularis (Junqueira) zeigt deutlich die Abhängigkeit des Chondrioms von der Intensität des Zellstoffwechsels. Die körnige Umwandlung eines stäbchenförmigen Mitochondrions während der Sekretionstätigkeit, nach HCl-Reizung, nach Reizung bestimmter Nerven mit Induktionsströmen (Rawlinson, Iwasaki; mit negativem Erfolg: Moley und Smith sowie Mühlethaler) und nach schwachen Pilocarpindosen ist in gleicher Weise als Folge eines erhöhten Energiebedarfes für die angeregte Sekretionsarbeit anzusehen.

2. Das Auftreten von Fetteinschlüssen und seine Bedeutung

Das Auftreten von Fetteinschlüssen nach pharmakologischer Reizung läßt sich wohl nur auf der Ebene toxischer Zellschädigung diskutieren. Das setzt jedoch eine Vorstellung von Herkunft und Natur dieser Gebilde voraus. Die supranuclearen Körnchenfelder, die dem Golgi-Apparat zugeordnet werden müssen, scheiden bei dieser Betrachtung aus, da sie mit klassi-

schen und modernen Methoden, wie z. B. mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-Methode (Leblond), stets an dieser Stelle gefunden werden. Die Beobachtung von Iwasaki, daß sich der Golgi-Apparat auch im infranuclearen Teil der Parotisstreifenstückzelle darstellen lasse, kann auch eine andere Deutung finden.

Fetteinschlüsse in Zellen sind meist in Abhängigkeit von der funktionellen Aktivität der betreffenden Drüse mehrfach, zwar nicht in Mundspeicheldrüsen, aber vor allem in Pankreas und Leber, beobachtet worden (Ma, Kater und Smith, Saguchi, Zollinger, Bourne u. a.). Das Verhalten der Fetttropfen in den Drüsenzellen des normal arbeitenden und pilocarpinisierten Pankreas (Saguchi) stimmt hinsichtlich Form, Lage und Größe im wesentlichen mit den hier geschilderten Befunden überein, wenn sich auch an der Submandibularis eine noch stärkere Vermehrung des sudanophilen Materials nach hohen Gaben von Pharmaka zeigte. Die überwiegende Zahl der Untersucher nimmt enge genetische Beziehungen zwischen Fetttropfen und Mitochondrien an. So befürworten d'Agata, Azzi und Cowdry eine direkte Umwandlung der Mitochondrien in Fettkugeln; Altmann, Regaud, Heidenhain, Dubreuil, Rasor, Noël, Saguchi (1919, 1949), zit. n. Zollinger, sowie Arnold, Kater und Smith beobachteten die Entstehung eines fettreichen „Zentrums“ in den Mitochondrien, und de Robertis sowie Bourne konnten zeigen, daß sich die Anzahl der Mitochondrien und Fetttropfen in der Zelle umgekehrt proportional zueinander verhält. Obwohl überzeugende cytologische Beobachtungen dieses Entstehungsprozesses nicht vorliegen, Bräm keine Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Fetttropfen sah, und Ma diesen zwar annimmt, aber auch die Fettbildung aus besonderen Liposomen und ebenso die sekundäre Anlagerung der Fettkugeln an Mitochondrien für möglich hält, scheinen doch innige Beziehungen zwischen diesen Zellbestandteilen zu bestehen. Dafür sprechen einmal das bevorzugte Auftreten beider an der Zellbasis der Streifenstücke sowie das Maximum an Tropfenzahl und -größe zur Zeit der stärksten Mitochondrienalteration, außerdem die bedeutende Rolle, welche den Mitochondrien für Fettsynthese und Fettabbau (Bourne) zugeschrieben wird. Ob allerdings das Fett der Einschlüsse aus den außerordentlich fett- und lipoidreichen Mitochondrien, die in der Leber nach Bensley 2% Cholesterin, 4% Lecithin und 29% Neutralfett enthalten, hervorgeht oder nur unter deren enzymatischen Einfluß aus dem Cytoplasma oder aus beiden entsteht, ist ungewiß. Gewiß aber darf die Rolle der in Mitochondrien lokalisierten Enzyme nicht unterschätzt werden. Pharmaka könnten diese empfindlichen Systeme blockieren. Ähnlich der für Mintacol und Physostigmin bekannten cholinesterasehemmenden Wirkung (Wirth) wäre ein hemmender Einfluß dieser beiden und anderer Pharmaka auf weitere Enzyme denkbar.

Die Mehrzahl der Untersucher fühlt sich bewogen, die funktionelle Bedeutung fettiger Einschlüsse, falls diese überhaupt zu eruieren versucht wurde, in einer Bereitstellung von Reservestoffen für die Bildung von Sekretgranula zu sehen (Saguchi, Laguesse, Mislawsky, Maximow,

Covell, Duthie u. a., zit. n. Saguchi). Auch das vermehrte Vorkommen von Fetttropfen in den Endstückzellen des Pankreas von lange fastenden Tieren (Laguesse, Ma) ist in diesem Sinne gedeutet worden.

Das Auftreten von Fetttropfen nach Phosphorvergiftung (Azzi, Cowdry), Diphtherietoxin- (d'Agata) und nach Nikotin-, Colchicin-, Arsenik-, Trypaflavin- und Nitrogen Mustard-Vergiftung (Bräm) findet freilich auf solche Weise keine Erklärung. Gleiches gilt für die hier vorgelegten Befunde nach Anwendung hochdosierter Pharmaka. Hier verbietet die Abhängigkeit des mengenmäßigen Vorkommens sudanophiler Substanz von der Höhe der angewandten Dosen die Annahme von vermehrter Fetttropfenbildung auf Grund einer gesteigerten sekretorischen Zellfunktion. Denn obwohl starke und schwache Pilocarpingaben die sekretorische Tätigkeit etwa gleich stark ansteigen ließen, wurden gleichartige Bilder nicht erzielt. Andererseits ergaben Mintacol und Physostigmin in toxischer Dosis, also Pharmaka, deren sekretionserregende Wirkung als nicht beträchtlich angesehen werden kann, gleiche Befunde wie hohe Pilocarpindosen. Die Tatsache, daß toxische andere Zellbilder als geringere Dosen hervorbringen, läßt es berechtigt erscheinen, für erstere auch eine spezifisch toxische Wirkung auf die Zellen dieses Organs anzunehmen. So sieht auch Mislawsky in den in Pankreaszellen pilocarpinierter Kaninchen auftretenden Fetttropfchen eine Vergiftungserscheinung. Der Eindruck einer nicht physiologischen Zellreaktion wird durch die beobachtete Ausstoßung des fettreichen Materials nach hohen Dosen in das Lumen des ausführenden Systems noch verstärkt. Daß sich die Zelle dieser Substanz entledigt, die kein Bestandteil des normalen Speichels ist, läßt die Fetttropfen, zumindest in solcher Menge, als ein Produkt erscheinen, das nicht im Zellstoffwechsel verwertet werden kann. Möglicherweise dienen sie auf Grund günstiger Lösungsbedingungen für das Pharmakon als Vehikel im Ausscheidungsprozeß der toxischen Stoffe oder deren Abbauprodukte. Die Tatsache, daß die Menge des sudanophilen Materials in Submandibularis, Leber und Nieren nach Anwendung hoher Pilocarpindosen die in Pankreas und Darm bei gleicher Dosierung merklich übertrifft, könnte die Vermutung einer Ausscheidung von Pilocarpin, Mintacol und Physostigmin durch Speichel, Galle und Harn wesentlich stützen, wenn auch für Pilocarpin lediglich eine Ausscheidung durch die Nieren beschrieben wird (Dixon und Ransom).

Die Bilder nach HCl- und kleinen Pilocarpindosen weichen nicht wesentlich von denen hungernder oder normal ernährter Tiere ab. Es konnte demnach hier keine deutliche Abhängigkeit der Fetttropfen von der Sekretionstätigkeit festgestellt werden.

Die Bedeutung des Auftretens einzelner Fetttropfen nach kleinen Dosen von Pilocarpin, bei HCl-, Hunger- und Normaltieren muß offen bleiben. Solche wurden auch in Speichelrohreithelien von Kolossoff bei der Katze und Yamaguchi beim Menschen beschrieben. Es scheint durchaus möglich, daß ihre Zahl alimentär beeinflusst werden kann, denn es gelang Metzner, an Schleimzellen der Submandibularis eines Kätzchens, das mit der Milchflasche ernährt wurde, Fetttropfen variierender Größe

basal nachzuweisen. Auch fetthaltiges Pigment — vielleicht Abnutzungspigment —, wie es Yamaguchi in Speichelrohreithelien von Menschen und Säugetieren nachwies, kann mit Sudanschwarz dargestellt werden.

3. Über den Sekretionsmodus der Streifenstücke

Eine sekretorische Tätigkeit der Streifenstückzelle erscheint sicher (Schaffer, Iwasaki, Stier, Macchi u. a.), eine rückresorbierende wird vielfach (Policard, Tupa, Bargmann) angenommen. Seit langem wird eine unterschiedliche Zusammensetzung des von Streifenstücken und Endstücken gelieferten Sekrets diskutiert, jedoch wurde über die Art des Sekrets keine Einigung erzielt. Die alte Auffassung der kalk- (Merkel) und wasserausscheidenden Funktion der Streifenstücke (Mislawsky und Smirnow, Heidenhain) wurde zugunsten der einer Entleerung von Sekretgranula verlassen (Pischinger, Takagi, Iwasaki, Macchi u. a.). Gibt es Anhaltspunkte für einen unterschiedlichen Sekretionsmodus von Streifen- und Endstückzellen und einer unterschiedlichen Beschaffenheit des von ihnen gelieferten Sekrets?

Bei diesen Betrachtungen sei es erlaubt, Streifenstücke und Ausführungsgänge unter dem Begriff „ausführendes System“ zusammenzufassen, denn Chondriom, Fetttropfen und Ribonucleotide zeigten in beiden Gangabschnitten stets ein gleiches Verhalten. Entsprechendes fand Stier bei der von ihm an der Submandibularis des Meerschweinchens ausgeführten Tetrazol-Reaktion. Aus den genannten morphologischen und histochemischen Daten darf deshalb auf eine analoge Rolle von Streifenstücken und Ausführungsgängen bei Sekretionsvorgängen geschlossen werden, zumal bei allen Methoden mehr oder weniger starke Abweichungen gegenüber den Endstücken bestanden.

Die trotz der aus den Ergebnissen der Tetrazol-Reaktion gewonnenen Ansicht einer besonders starken Beteiligung des ausführenden Systems an der Sekretion (Stier) auffällige Ribonucleotidarmut dieser Gangabschnitte, die auch von Macchi an den Streifenstücken der Submandibularis für alle Sekretionsphasen hervorgehoben wird, lenkt, weil sie so offensichtlich im Gegensatz zu den überaus reichlich mit Ribonucleotiden versehenen Endstückzellen der Submandibularis steht, die Aufmerksamkeit auf den Proteingehalt des vom ausführenden System gelieferten Speichels. Drüsenzellen, die eiweißreiches Sekret produzieren, wie die der Mundspeicheldrüsen und des Pankreas der Säuger (Brachet, Caspersson und Mitarb., Noback und Montagna, Vendrely-Randavel), der Speicheldrüsen der Invertebraten (Painter) und die der Mamma (Dempsey, Bunting und Wislocki) sind auffallend ribonucleotidreich. Zellen, die lipoidähnliches Sekret produzieren, wie Talgdrüsen (Noback und Montagna), oder solches ohne Proteinnatur, wie die Deckzellen der Magendrüsen (Macchi), weisen nur geringe Basophilie auf. Bestehen aber enge Beziehungen zwischen Ribonucleotidgehalt und Proteinsynthese (Caspersson), so muß aus der Ribonucleotidarmut des ausführenden Systems die Lieferung eines eiweißarmen Sekrets gefolgert werden.

Ob ein solcher Schluß für Streifenstücke und Ausführungsgänge berechtigt ist, kann vorerst nicht entschieden werden. Denn es erscheint durchaus offen, ob die von den Streifenstückzellen gelieferten Sekretgranula von Eiweiß- (Iwasaki) oder Phospholipoidnatur (Cabanès) sind (Macchi). Sollte der vom ausführenden System produzierte Speichel aber reichlich Proteine enthalten, nach Junqueira und Mitarb. (1948; 1949) Proteine mit Sulfhydrylgruppen und vom Typ aromatischer Aminosäuren, so dürfte die Rolle der Ribonucleotide für deren Synthese in Streifenstücken und Ausführungsgängen nicht von besonderer Bedeutung sein.

Mislawsky und Smirnow, Heidenhain und auch Järvi plädieren für die Produktion eines dünnflüssigen Streifenstücksekrets, dessen flüssige Konsistenz durch reichlichen Wassergehalt bedingt sei. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da der Gehalt an Sekretgranula in stapelnden Endstücken den in Streifenstücken um ein Vielfaches übertrifft. Falls die spärlichen Granula der Streifenstücke von Eiweißnatur sind, wäre es also verständlich, daß hier eine weit geringere Proteinsynthese als in den Endstückzellen statthat und der Ribonucleidgehalt dementsprechend niedriger ist.

IV. Zusammenfassung

1. Die Wirkung von Pilocarpin, Physostigmin und Mintacol auf Chondriom, Golgi-Apparat und Ribonucleotide in der Streifenstückzelle der Gl. submandibularis der weißen Maus wurde genauer untersucht und mit den Befunden an ungereizten und unter physiologischen Reizen stehenden Tieren verglichen. Besonders berücksichtigt wurde der Einfluß einer verschiedenen hohen Dosierung der Pharmaka in ihrer Auswirkung auf das Zellbild.

2. Am Chondriom kommt es bei allen angewandten Reizen zu körnigem Zerfall, zu einer Vergrößerung und Zerstreuung seiner körnigen Bestandteile und im Zusammenhang damit zum Verlust der Basalstreifung. Diese Vorgänge werden auf die Auslösung eines gesteigerten Zellstoffwechsels zurückgeführt.

3. Im Cytoplasma ungereizter oder schwach gereizter Drüsen finden sich vereinzelte Fetteinschlüsse. Hohe Dosen der genannten Pharmaka haben das Auftreten zahlreicher Fetteinschlüsse zur Folge, die später in das Lumen ausgestoßen werden. Dieser Befund wird als Folge einer toxischen Zellschädigung betrachtet.

4. Der Golgi-Apparat erscheint supranuclear und zeigt sich in Streifenstücken und Ausführungsgängen von Sekretionsphasen wenig beeinflusst.

5. Gegenüber den Endstückzellen enthalten die Zellen der Streifenstücke und Ausführungsgänge unverhältnismäßig wenig Ribonucleotide. Ihr Bestand wird durch Anwendung pharmakologischer Reize nicht nachweisbar verändert. Die gegensätzliche Ribonucleotidverteilung im ausführenden System und in den Endstückzellen wird in bezug auf einen unterschiedlichen Sekretionsmodus in diesen beiden Drüsenanteilen erörtert.

Literatur

- d'Agata, G., 1912: *Mschr. Anat. u. Physiol.* 29, 443.
Altmann, R., Zit. n. Zollinger, 1950: *Rev. d'Hématologie* 5, 696.
Arnold, J., 1905: *Zieglers Beiträge* 38, 421.
Aunap, E., 1951: *Z. f. mikr.-anat. Forsch.* 24, 412.
Azzi, A., 1914: *Zbl. Path.* 25, 7.
Baker, J. R., 1949: *Quart. J. Micr. Sci.* 90, 295.
Bargmann, W., 1951: *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Bd. 2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
Bensley, R. R., Zit. n. Zollinger, 1950: *Rev. d'Hématologie* 5, 696.
Bourne, G., 1942: *Cytology and cell physiology*. Clarendon Press, London.
— 1951: *J. Roy. Micr. Soc.* 70, 367.
Brachet, J., 1947: *Embryologie chimique*. Masson, Paris.
Bräm, A., 1951: *Acta Anat.* 15, 385.
Cabanes, F. Th., 1949: *C. R. Sc. Biol.* 145, 250.
Caspersson, T. O., 1950: *Cell growth and cell function*. W. W. Norton & Co.
—, Landstrom-Hydén und L. Aquilonius, 1944: *Chromosoma* 2, 11.
Cowdry, E. V., 1926: *Arch. Path. (Am.)* 1, 237.
Dempsey, W. E., H. Bunting and G. Wislocki, 1947: *Am. J. of Anat.* 81, 509.
Dixon, W. E., und Ransom, 1924: In: A. Heffters Hdb. d. exp. Pharmakologie, 2. Bd., 2. Hälfte, S. 756. Berlin, Springer-Verlag.
Dubreuil, Zit. n. Zollinger, 1950: *Rev. d'Hématologie* 5, 696.
Gatenby, J. B., 1919: *J. Roy. Micr. Sci.*
Harman, J. W., 1950: *Exper. Cell Res.* 1, 382, 394.
Heidenhain, M., 1911: *Plasma und Zelle*, 2. Lief.
Hiki, Y., 1935: *Tokyo Igakkwai Zasshi* 47.
Iwasaki, T., 1939: *Jap. J. of med. Sci. Pathol.* 4, 55.
Järvi, O., 1940: *Z. Zellforsch.* 50, 98.
Junqueira, L. C. U., 1951: *Exp. Cell Res.* 2, 327.
—, M. Rabinovitch and A. Fayer, 1948: *Anat. Rec.* 100, 682.
— 1949: *J. of Cell a. Comp. Phys.* 34, 129.
Kater, J. McA., and D. M. Smith, 1952: *Anat. Rec.* 52, 55.
Kolossow, A., 1902: *Anat. Anz.* 21, 226.
Kunitz, M., 1940: *J. Gen. Physiol.* 24, 15.
Laguesse, E., Zit. n. Saguchi, 1949: *Kanazawa Medical College*.
Leblond, C. P., 1950: *Am. J. of Anat.* 86, 1.
Ma, W. C., 1924: *Anat. Rec.* 27, 47.
Macchi, G., 1951: *Arch. ital. Anat. e Embriol.* 56, 39.
Merkel, F., 1885: *Rektoratsprogramm*, Leipzig.
Metzner, R., 1907: In: W. Nagels Hdb. d. Physiol. d. Menschen, Bd. 2. Braunschweig.
Miller, S. P., 1922: *Anat. Rec.* 23, 205.
Mislawsky, A. N., 1911: *Anat. Anz.* 39, 497.
— und A. E. Smirnow, 1896: *Arch. f. Anat. u. Physiol.*
Moloy, H. C., and I. H. Smith, 1950: *Anat. Rec.* 45, 377.
Mühlethaler, E., 1942: *Z. f. mikr.-anat. Forsch.* 52, 291.
Noback, Ch., and W. Montagna, 1947: *Am. J. of Anat.* 81, 39.
— 1947: *Am. J. of Anat.* 81, 345.
Noël, R., Zit. n. Zollinger, 1950: *Rev. d'Hématologie* 5, 696.
Painter, S. Th., 1945: *J. of Exp. Zool.* 100, 525.

- Pischinger, A., 1924: Z. mikr.-anat. Forsch. 1, 437.
Policard, A., 1926: Bull. d'histol. appl. 3, 286.
Rasor, H., 1913: Frankf. Z. Path. 14, 359.
Rawlinson, H. E., 1935: Anat. Rec. 63, 295.
Regaud, Cl., Zit. n. Zollinger, 1950: Rev. d'Hématologie 5, 696.
— et J. Mawas, 1909: Compt. rend. Soc. Biol., Paris 66, 461.
Ries, E., 1935: Z. f. Zellforsch. 22, 523.
de Robertis, E., 1939: Rev. Soc. Argent. de Biol. 15, 94.
Roberts, H. S., 1949: Anat. Rec. 104, 165.
Saguchi, S., 1919: Am. J. Anat. 26, 547.
— 1949: Kanazawa Medical College 1.
Schaffer, J., 1927: In: Hdb. d. mikr. Anat. d. Menschen, 2. Bd., 1. Teil, S. 1.
Berlin, Springer-Verlag.
Stier, A., 1952: Z. f. Anat. u. Entw.gesch. 116, 399.
Takagi, K., 1925: Z. f. mikr.-anat. Forsch. 2, 254.
Tupa, A., 1926: Bull. d'histol. appl. 3, 285.
Vendrelly-Randavel, C., 1949: Acta Anat. 7, 225.
Wirth, W., 1949: Arch. exp. Path. u. Pharm. 207, 547.
Worley, L. G., 1946: Ann. New York Acad. of Sci. 47, 1.
Yamaguchi, S., 1925: Beitr. z. Pathol. Anat. u. Allgem. Pathol. 73, 113.
Zeiger, K., 1952: Verh. d. Anat. Ges., 50. Vers., Marburg, S. 9.
Zimmermann, K. W., 1927: In: Hdb. d. mikr. Anat. d. Menschen, 5. Bd., 1. Teil.
Berlin, Springer-Verlag.
Zollinger, H. U., 1950: Rev. d'Hématologie 5, 696.

The Breakdown of Isolated Yolk Granules by Cations¹

By

Edward S. Essner²

Department of Zoology, University of Pennsylvania

With 7 Text-Figures

(Received April 28, 1953)

I. Introduction

The chemical and enzymatic characterization of protoplasmic granules isolated by fractionation and differential centrifugation is now quite well advanced (Bensley and Hoerr 1954, Claude 1946). For a discussion of the original procedures see Hoerr (1945).

However, investigations concerned with the fundamental action of chemical and physical agents have been limited to a few dispersed, qualitative observations. For example, red echinochrome vacuoles in the egg of the sea urchin are sensitive to and readily disrupted by free calcium ions (Heilbrunn 1928). They may also undergo coalescence in the presence of calcium (Harris 1943). Pigment granules in several other marine invertebrate eggs exhibit a similar sensitivity (Costello 1932). In addition, activation of the sea urchin egg is typically marked by a wave-like breakdown of cortical granules. This "cortical layer response" has been interpreted in terms of a theory involving the release of free calcium from the cell cortex (Heilbrunn 1943). In addition, the lysis of isolated yolk granules under a wide variety of conditions has been observed by Terry (1950). He found these particles to be sensitive to calcium and other divalent cations. Similar observations for yolk platelets from crushed neurula cells have been recorded (Holtfreter 1946).

That the morphology and enzyme distribution of isolated mitochondria are also directly dependent upon the chemical environment has recently been emphasized by Schneider and Hogeboom (1951).

¹ A thesis in zoology presented to the faculty of the Graduate School of the University of Pennsylvania in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

² Present address: Laboratory of Chemical Pharmacology, National Cancer Institute, U.S. Public Health Service, Bethesda, Maryland.

For example, it has been found that the cytochrome C activity of isolated mitochondria is severely altered by the nature of the fractionation medium (Schneider, Claude and Hogeboom 1948). In addition, Kennedy and Lehinger (1948, 1949) found marked variations in enzyme activity on mitochondria isolated from water homogenates as opposed to salt solutions. Further cytological and biochemical evidence suggests that the stability of isolated mitochondria is best maintained in solutions of hypertonic sucrose in the absence of electrolytes (Hogeboom, Schneider and Pallade 1948). At least this appears to be true of secretory granules for a large proportion may actually disintegrate in the presence of certain salts. Indeed the problem of what constitutes a proper *in vitro* medium for the isolation of granules from living material has never adequately been settled. Suitable separation procedures and extraction media to insure maintainance of granule stability are therefore of prime concern (Schneider and Hogeboom 1951).

In addition, within living cells, the function of certain granules typically depends on the pathways which eventually lead to their disruption. For example, yolk substance is first synthesized into solid platelets, presumably stored in this form, and subsequently dissolved, releasing the interior material into solution. Apparently yolk utilization has generally been considered as a strictly enzymatic reaction although at present, there is no real evidence in support of such a view. Thus a knowledge of the fundamental granule lysis mechanism is essential both to an understanding of the intracellular lysis reaction as well as *in vitro* fractionation studies.

The yolk platelet in the ovarian frog egg adequately meets the requirements for an investigation of this type. Under the proper conditions, this particle can readily be separated in quantity from the cell and maintained intact in solution. Conversely, in the presence of calcium and other cations which normally occur in protoplasm, the platelet is rapidly dissolved.

The present study is an attempt to utilize this lysis reaction in measuring, on a semiquantitative basis, the breakdown of yolk platelets by protoplasmic cations. The isolation of pure yolk by a simple differential centrifugation procedure is outlined and a photometric method for the measurement of yolk platelet lysis is described.

I should like to thank Dr. L. V. Heilbrunn for the helpful criticisms and suggestions he has made during the progress of this work.

II. Material and Methods

The immature, ovarian egg of the frog *Rana pipiens* was exclusively used in this study. This egg is relatively large, contains a high proportion of yolk and is readily available throughout the winter and spring.

Homogenization. In preparing the original homogenate, a single ovary was removed and washed several times in potassium phosphate buffer (K_2HPO_4 and KH_2PO_4) at p_H 6.8 to 7.0. It was then transferred to 5 ml. of buffer and crushed by hand in a loose-fitting, round bottom, glass homogenizer. The eggs are large and 100% homogenization in 2 min-

utes was readily obtained. The above procedure together with subsequent centrifugations were carried out at room temperature.

The homogenate was diluted with phosphate buffer to 15 ml., passed through 2 layers of cheese cloth, and brought to a final volume of 100 ml. This represented a 5% to 8% homogenate depending on the original wet weight of ovary. It was jet black, smooth (with no appearance of coagulation) and easily separated by differential centrifugation.

Differential Centrifugation. The separation procedure employed was based upon the need for a large quantity of purified yolk. For a quantitative fractionation of yolk, melanin and mitochondria, supported by dry weight determinations, see Recknagel (1950). The original homogenate was transferred to 15 ml. centrifuge tubes and submitted to 4 successive, low speed centrifugations; first, in the horizontal yoke of an International Centrifuge (size I-type SB) and later, in a table model, International Clinical Centrifuge. A diagram of this procedure is shown in Fig. 1.

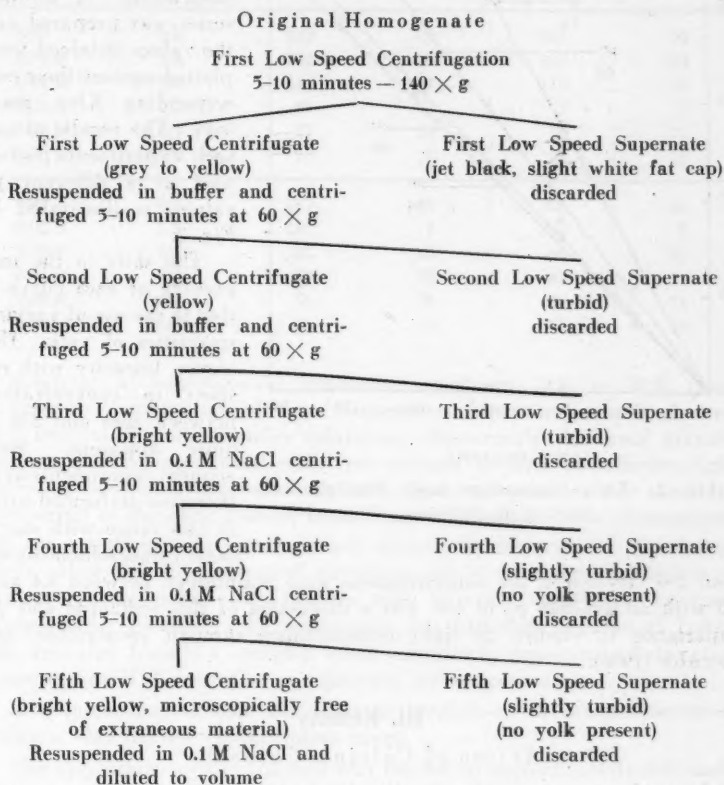


Fig. 1. Fractionation of Frog Egg Yolk by Differential Centrifugation.

The final low speed yolk pellet was bright yellow and microscopically free from other granules and extraneous material. The yolk platelet itself, measured about 3 to 14 microns in length, was slightly convex on both faces and partially transparent. Many smaller, irregular particles, presumably yolk, were also typically present. For a discussion of the separation and characterization of 2 distinct types of yolk granules, see Panijel (1950).

Photometric Procedure. The Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter was exclusively used in this study. All measurements were made through a No. 42, blue filter (approximate spectral range, 400 to 465 millimicrons).

It was first necessary to determine whether a linear correlation existed

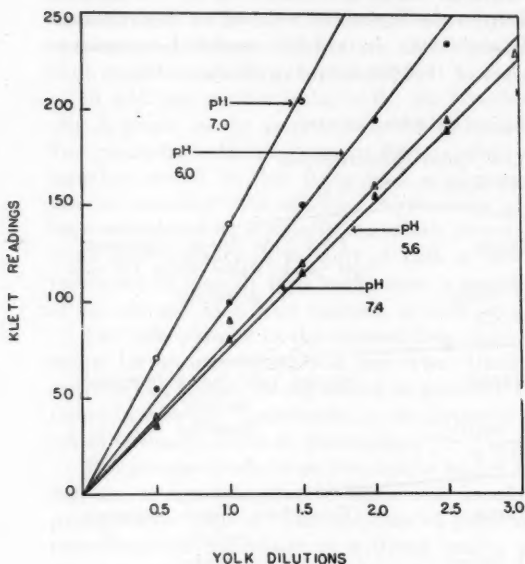


Fig. 2. Klett Summerson Scale Readings vs. NaCl Yolk Dilutions.

between various concentration of yolk and the quantity of light passing through each suspension. A dilution series was prepared and the values obtained were plotted against their corresponding Klett readings. The results of one such experiment, performed at 4 different p_H values, is illustrated in Fig. 2.

The shift in the magnitude of each curve is due to the use of varying quantities of yolk. However, linearity with respect to concentration between zero and 250 is quite apparent. Subsequent experiments were therefore performed within this range with maximum values seldom higher

than 250. Hydrogen ion concentrations were maintained between 5.4 and 7.0 with an average p_H of 6.0. For a discussion of this technique and its importance in studies on light transmittance through suspensions, see Jacobs (1950).

III. Results

Action of Calcium Chloride

A rapid, extensive lysis of yolk platelets occurred in the presence of free calcium. Known yolk quantities were added to 5 ml. of isotonic sodium

chloride in a standard Klett tube and adjusted to give a reading between 200 and 250. Such a suspension showed no measurable change in light transmittance apart from experimental error fluctuations. It was considered as zero percent lysis and all subsequent Klett readings were expressed as a percent of this value. The same amount of yolk was then added to a series of tubes at specific calcium concentrations. Due to rapid settling, these suspensions were shaken immediately prior to each determination. Tab. 1 indicates the results of calcium lysis in two typical experiments.

Table 1.

The Breakdown of Yolk Granules at Different Calcium Chloride Concentrations.

calcium chloride conc.	ratio of isotonic CaCl_2 to NaCl in ml.	Klett reading at zero time	percentage of granules lysed at zero time	Klett reading after 10-15 min.	percentage of granules lysed after 10-15 min.
0.00	0/5	242	00	255	00
0.02 M	1/4	242	00	245	00
0.04 M	2/3	144	41	110	57
0.06 M	3/2	67	73	72	72
0.08 M	4/1	57	78	60	77
0.10 M	5/0	57	70	65	75
0.00	0/5	257	00	255	00
0.02 M	1/4	242	6	242	5
0.04 M	2/3	147	43	99	61
0.06 M	3/2	60	77	67	74
0.08 M	4/1	55	79	67	74
0.10 M	5/0	55	79	55	79

Solutions at approximate isotonicity exhibited 75% to 79% lysis. Microscopic examination of these suspensions, however, actually showed very few intact yolk granules (platelets). Apparently the lysed granule contents quickly recombined with free calcium to form an effective light scattering complex. Approximately 80% light transmittance was therefore interpreted as complete granule breakdown. Fortunately, this phenomenon did not interfere with measurements during the progress of the experiment. However, in solutions of strontium and barium, light scattering at certain concentrations was intense and seriously hampered accurate measurement. Similarly, the magnesium ion, although capable of lysing yolk granules, formed a complex which completely prevented photometric measurement of the reaction at relatively low concentrations.

It is interesting to note that granule breakdown in calcium occurred within a very narrow concentration range.

The appearance of the reaction was limited to approximately 0.02 mole of calcium chloride. The striking effect produced by concentrations within this critical range, upon the actual lysis rate, will later become apparent.

Microscopically, the reaction did not resemble red blood cell hemolysis nor could it be compared with the lysis of echinochrome granules. Thus there was no measurable volume change in hypotonic solution nor membrane disruption as such, with subsequent release of the interior material. Actually, the yolk granule was first split into numerous solid strips which appeared frayed and these slowly dissolved. For a description of the reaction, see Terry (1950).

Action of Strontium Chloride and Barium Chloride

Yolk granule breakdown also occurred in solutions of strontium and barium. The results of 2 typical experiments are shown in Tables 2 and 3.

Table 2.

The Breakdown of Yolk Granules at Different Strontium Chloride Concentrations.

strontium chloride conc.	ratio of isotonic SrCl_2 to isotonic NaCl in ml.	Klett reading at zero time	percentage of granules lysed at zero time	Klett reading after 15 min.	percentage of granules lysed after 15 min.
0.00	0/5	220	00	220	00
0.02 M	1/4	234	—	246	—
0.04 M	2/3	262	—	200	9
0.06 M	3/2	50	77	50	77
0.08 M	4/1	36	84	40	82
0.10 M	5/0	40	86	35	84

Table 3.

The Breakdown of Yolk Granules at Different Barium Chloride Concentrations.

barium chloride conc.	ratio of isotonic BaCl_2 to isotonic NaCl in ml.	Klett reading at zero time	percentage of granules lysed at zero time	Klett reading after 30 min.	percentage of granules lysed after 30 min.
0.00	0/5	224	00	218	00
0.02 M	1/4	276	—	250	—
0.04 M	2/3	73	67	42	81
0.06 M	3/2	55	76	42	81
0.08 M	4/1	50	78	42	81
0.10 M	5/0	50	78	42	81

At 0.02 M and 0.04 M the readings increased above the sodium chloride control value. Apparently the light scattering properties of this cation-protein complex were more effective than in the case of calcium chloride. However, these data are included to illustrate the extensive lysis which occurred at higher concentrations.

Hypertonic Solutions

Apart from the action of divalent cations, hypertonic sodium and potassium chloride solutions were also effective as potent lysing agents. Two typical experiments are shown in Fig. 3.

At isotonic concentrations no measurable change occurred in light transmittance and these solutions were therefore utilized as controls. However, at 0.4 M and above, there was a sudden, rapid breakdown of yolk granules with no detectable interference due to recombination effects as previously discussed.

Action of Temperature

Fractionation studies have typically involved the use of low temperatures. This is particularly true of enzyme experiments where an attempt is made to suppress proteolytic activity at the time of homogenization. It is possible, however, that such a procedure alters the fundamental structure of the granule itself. That this supposition may be true for the yolk granule is indicated in the data shown in Fig. 4.

Yolk and various concentrations of calcium chloride solution were separately cooled at 2 to 3 degrees C. Determinations were then made in the usual manner by addition of standard yolk quantities at the specified time, to each calcium concentration. It should be noted that the value at zero calcium concentration (isotonic sodium chloride) in the cold, did not change. This indicated that yolk granules in the absence of calcium were not lysed at low temperatures.

Although some lysis occurred at higher calcium concentrations, cold had a marked effect in preventing lysis at lower concentrations. In addition, the reaction was only partially reversible and did not proceed to completion upon return to room temperature.

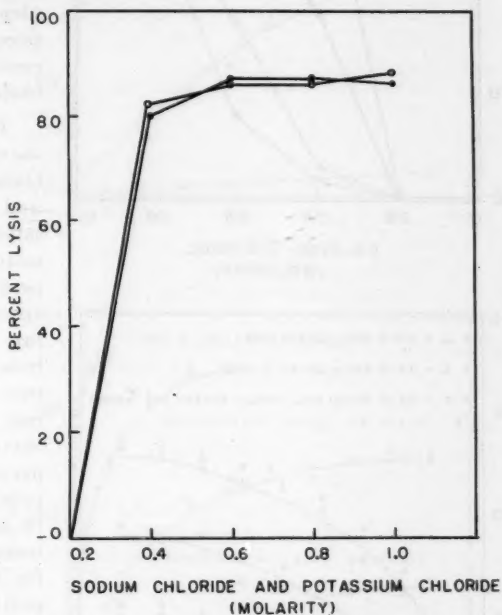
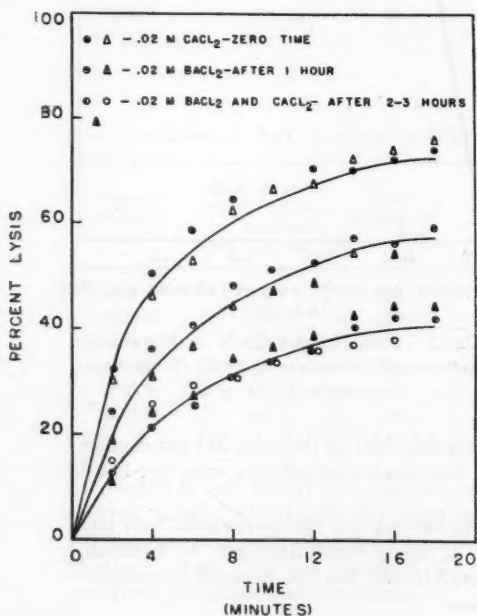
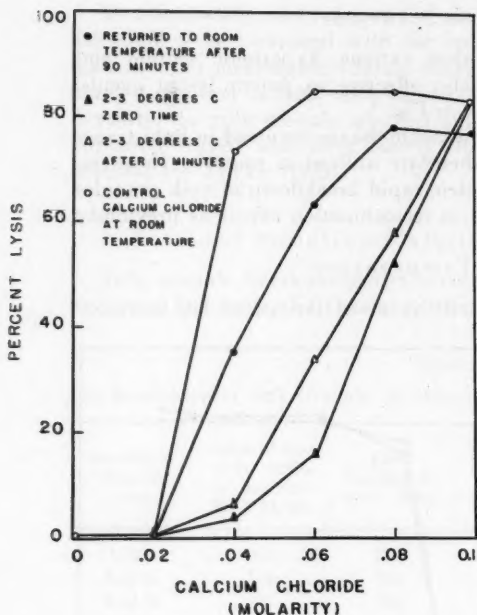


Fig. 3. Yolk Granule Lysis in Hypertonic Sodium and Potassium Chloride (Room Temperature- p_{H} 6.0 to 6.2).



Measurement of the Rate of Granule Lysis

It was apparent from an inspection of the data presented in Table 1 that yolk granule lysis in 0.02 M calcium chloride, proceeded very slowly or not at all, whereas an increase of 0.02 mole caused 40% to 60% breakdown. It was therefore possible to choose an intermediate calcium concentration (dependent upon the temperature) in which the time course of the lysis reaction could be measured.

Typical rate curves are shown in Fig. 5. It is obvious from these data, that barium and calcium maintained the same reaction rates when run under similar ionic and temperature conditions. It is also apparent that both the reaction rate and the final percentage of lysis decreased with time. Thus two measurements of the lysis rate in calcium chloride (upper curve, Fig. 5), using freshly prepared yolk, attained approximately 75% lysis in 18 minutes. With yolk which remained at room temperature for one hour following homogenization (middle curve, Fig. 5) only 58% lysis in barium was attained in 18 minutes. A more pronounced effect was obtained with yolk kept at room tem-

Fig. 4. Action of Temperature on Granule Lysis in Calcium Chloride (pH 6.1-6.9).

Fig. 5. Rate of Granule Lysis in Calcium and Barium at Room Temperature.

perature for 2 or 3 hours following its separation from the egg. In this case two separate measurements were made in calcium and one measurement in barium. Similar data were obtained for both ions (lower curve, Fig. 5).

Sensitivity to Free Calcium

The range within which yolk granules became sensitive to free calcium has been indicated. However, the data in Table 1 can only be compared with respect to the final end points. The speed with which the lysis reaction occurred at different calcium concentrations was not indicated.

An experiment to determine the actual reaction rates using the procedure discussed for Fig. 5, was therefore performed. The degree of granule lysis (at 19 degrees C.) was expressed as a percent of the original control. This solution was calcium free and typically contained 5 ml. of 0.1 M sodium chloride.

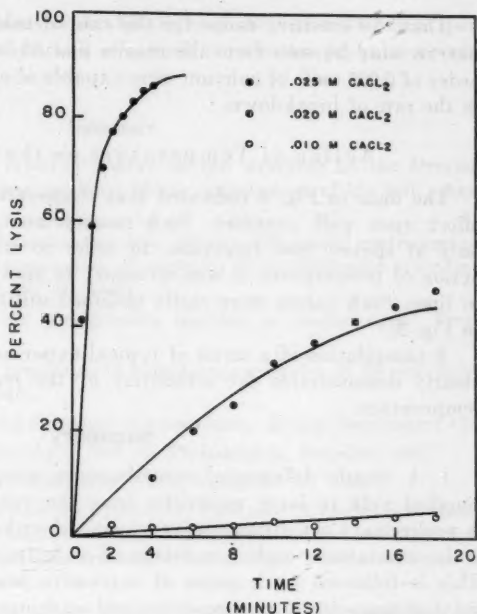


Fig. 6. Rate of Granule Lysis at Various Calcium Concentrations (Room Temperature).

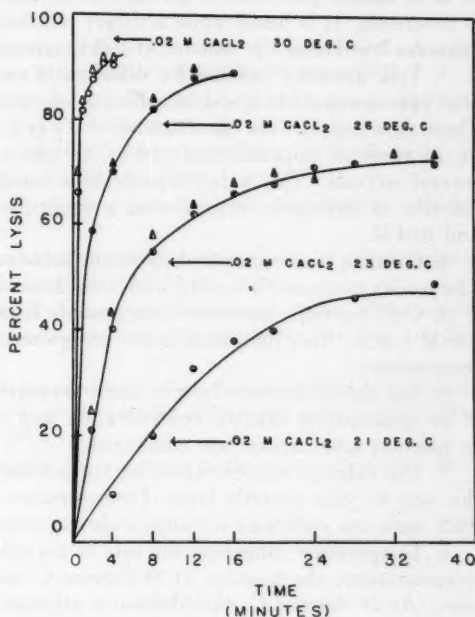


Fig. 7. Action of Temperature on the Rate of Granule Lysis in Calcium Chloride.

That the sensitive range for the rate of calcium lysis was indeed very narrow may be seen from the results plotted in Fig. 6. Differences in the order of 0.005 mole of calcium were capable of causing a measurable change in the rate of breakdown.

Action of Temperature on the Rate of Lysis

The data in Fig. 4 indicated that temperature may produce a marked effect upon yolk granules. Such measurement, however, was determined only at spaced time intervals. In order to obtain a true picture of the action of temperature, it was necessary to study rate changes with respect to time. Such values were easily obtained utilizing the technique indicated in Fig. 5.

A compilation of a series of typical experiments is shown in Fig. 7 and clearly demonstrates the sensitivity of the reaction to small changes in temperature.

Summary

1. A simple differential centrifugation procedure for the isolation of purified yolk in large quantities from the ovarian frog egg is presented. A preliminary centrifugation in neutral phosphate buffer at $140 \times g$, effectively separates a high percentage of yolk from the original homogenate. This is followed by a series of successive low speed centrifugations involving concomitant resuspensions and washings in isotonic sodium chloride.

2. A simple photometric procedure for the study of yolk granule lysis is described. It is based upon a direct relation between the percentage of granules lysed, and the amount of light transmitted.

3. Yolk granules isolated by differential centrifugation from immature frog eggs are quickly lysed in solutions of calcium, strontium and barium. These data support the observations of Terry (1950). In isotonic solutions, an increase of approximately 80% in light transmittance occurs within several seconds. This value represents a complete lysis of granules. The reaction is extremely sensitive at a concentration range between 0.02 M and 0.04 M.

4. Granule lysis occurs in hypertonic solutions of potassium and sodium. The results compare favorably with lysis data obtained for calcium chloride.

5. Cold partially prevents yolk granule breakdown between 0.04 M and 0.08 M CaCl_2 . This inhibition is not completely reversed on return to room temperature.

6. The rate of granule lysis is easily measured by the judicious selection of an appropriate calcium concentration and temperature. Reaction rates in calcium and barium are compared.

7. The calcium concentration within a sensitive range markedly affects the rate of yolk granule lysis. Concentration differences in the order of 0.005 mole are sufficient to cause wide variation in lysis rates.

8. Temperature influences the rate of granule lysis. At constant calcium concentrations, the reaction at 30 degrees C. reaches equilibrium in 4 minutes. At 21 degrees C. equilibrium is attained after 28 minutes.

9. There is a marked decrease in the slope of the curve and final percentage of lysis for yolk which has remained at room temperature several hours following homogenization.

Literature

- Bensley, R. R., and N. L. Hoerr: Studies on cell structure by the freezing-drying method. V. The chemical basis of the organization of the cell. *Anat. Rec.* 60, 449 (1954).
- Claude, A.: Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I. Problems, methods and preparation of extract. II. Experimental procedures and results. *J. Exp. Med.* 84, 51 (1946).
- Costello, D. P.: The surface precipitation reaction in marine eggs. *Protoplasma* 17, 239 (1952).
- Harris, D. L.: The osmotic properties of cytoplasmic granules of the sea urchin egg. *Biol. Bull.* 85, 179 (1945).
- Heilbrunn, L. V.: The colloid chemistry of protoplasm. Berlin, Borntraeger 1928.
- An outline of general physiology, 2nd ed. Philadelphia, Saunders 1945.
- Hoerr, N. L.: Frontiers in cytochemistry. *Biol. Symposia* 10, 1945.
- Hogeboom, G. H., W. C. Schneider and G. E. Pallade: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* 172, 619 (1948).
- Holtfreter, J.: Experiments on the formed inclusions of the amphibian egg. I. The effect of p_{H} and electrolytes on yolk and lipochondria. *J. Exp. Zool.* 101, 355 (1946).
- Jacobs, M. H.: Osmotic properties of the erythrocyte. I. Introduction. A simple method for studying the rate of hemolysis. *Biol. Bull.* 58, 104 (1950).
- Kennedy, E. P., and A. L. Lehinger: Intracellular structures and the fatty acid oxidase system of rat liver. *J. Biol. Chem.* 172, 847 (1948).
- Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *Ibid.* 179, 957 (1949).
- Panijel, J.: L'organisation du vitellus dans les œufs d'amphibiens. *Biochim. Biophys. Acta* 5, 345 (1950).
- Recknagel, R. O.: Localization of cytochrome oxidase on the mitochondria of the frog egg. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 35, 111 (1950).
- Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom: Cytochemical studies of mammalian cytochrome *c* and succinoxidase activity in rat liver fractions. *J. Biol. Chem.* 172, 451 (1948).
- Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom: Cytochemical studies of mammalian tissues: The isolation of cell components by differential centrifugation: A review. *Cancer Res.* 11, 1 (1951).
- Terry, R. L.: The surface precipitation reaction in the ovarian frog egg. *Protoplasma* 39, 206 (1950).

Entwicklung und Nekrose einiger kurzlebiger Pflanzenhaare

Von

Ilse Laber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 6 Textabbildungen

(Eingelangt am 27. Februar 1933)

I. Einleitung

Über die Lebensdauer der Haare finden sich schon bei den alten Botanikern gelegentliche Beobachtungen. Sie beschreiben, daß die Haare mancher Pflanzen frühzeitig absterben und sich dann mit Luft füllen. 1867 bringt Weiß hiezu schon nähere Angaben. Zehn Jahre später führt De Bary eine Scheidung der Haare in vergängliche = transitorische und in persistierende durch. Eine zusammenfassende Arbeit über die Lebensdauer der Pflanzenhaare veröffentlichte Burkhardt 1912. Er bringt eine für seine Versuche günstige Einteilung in Deckhaare (mit weiteren Untergruppen), in Drüsenhaare, Blütenhaare, Flughaare und Wurzelhaare. Aus seinen Ausführungen ergibt sich, daß die Flughaare, die Wurzelhaare, die Trichome der Laubknospen sowie die borstigen Haare an den Früchten frühzeitig zugrunde gehen. Ebenso Wollhaare, Seidenhaare und die einzellreihigen Filzhaare, die schon auf kaum entfalteten Blättern luftgefüllt oder bis zum Schwinden des Lumens verdickt sind. Von den Schild-, Baum- und Peitschenhaaren sterben zumindest die Endzellen bald ab. Auf eben ausgebildeten Blättern degenerieren die einzelligen weichen Haare mit mäßig verdickten Membranen sowie die Haare mit starrer Endzelle. Etwas später folgen die T-förmigen Haare (zumindest deren Endzelle) und die Zottenhaare. Langlebig sind die einzellreihigen und die einzelligen borstigen Haare, Brennhaare, Drüsenhaare, Reusenhaare und Gallenhaare. Die Büschelhaare sterben nach Burkhardt nur an Pflanzen, die blattoberseits ihr Haarkleid abwerfen (wie *Correa*, *Hedera*, *Tilia*, *Quercus*), frühzeitig und sind dort schon an jungen Blättern luftgefüllt. Im allgemeinen verlieren sie aber erst an sehr alten Blättern ihren lebenden Inhalt, der dann durch Luft ersetzt wird. Nach Weiß dagegen sterben die Büschelhaare früher ab, verfallen und verfilzen sich dabei dicht.

Während des Absterbens treten an den Haaren oftmals Formveränderungen auf, die sich infolge Turgoränderungen und Kohäsionswirkungen ergeben. Sie bestehen meist im Einsinken und Schrumpfen der sonst unverändert bleibenden dünnen Zellwände. Sie können sich in Zufallsformen, aber auch in Form charakteristischer Veränderungen, die durch einen bestimmten Zellwandbau gegeben sind, äußern.

Sind die Membranen der absterbenden Haare jedoch so verdickt, daß keine mechanischen Deformationen mehr stattfinden können, so tritt entweder Luft in die

Zellen oder diese werden bis zum Schwinden des Lumens verdickt. Über das Auftreten von Luft in normal luftführenden absterbenden Haaren hat Holle 1913 berichtet. Nach ihm sind die Haare vor allem durch ihre Membranbeschaffenheit in einem bestimmten Alter für die Luftfüllung eingerichtet. Lufterfüllte Haare finden sich unter den kurzlebigen häufig vor. Z. B. bei den Wollhaaren, Büschel- und Baumhaaren, bei den Schildhaaren, Gliederhaaren und Zottenhaaren, bei manchen Peitschenhaaren und Haaren mit starrer Endzelle, bei den Knospenhaaren, den Flughaaren usw. De Bary erwähnt 1877 auch die Luftfüllung der nichtdrüsigen Kopfhaare einiger *Atriplex*- und *Chenopodium*-Arten.

Bei anderen Haaren, z. B. vielen einzelligen Wollhaaren, T-förmigen Haaren, Peitschenhaaren, Haaren mit starrer Endzelle und anderen erfolgt nach dem Tode eine vollständige Ausfüllung des Lumens.

Finden in den Haarzellen keine Veränderungen mehr statt, so ist damit ein endgültiger Zustand erreicht, in dem das Haar, solange das Tragorgan vorhanden ist, auf der Pflanze persistiert. Manchmal werden jedoch Haare, oder zumindest Haarteile, frühzeitig abgeworfen. Der Zeitpunkt dieses Haarverlustes ist aber bei den verschiedenen Pflanzen unterschiedlich. Über den normalen Haarabwurf finden sich, wie Weiß 1867 mitteilt, schon bei Grew (1682) und Malpighi (1686) Beobachtungen. Keller gliedert 1891 in einer eingehenden Arbeit den Haarverlust in vier Typen, wobei der Bau des Haares und die Art und Weise des Abfalles unter gemeinsame Gesichtspunkte gestellt werden. Die nach dem Abwurf in der Regel zurückbleibenden Basalzellen sind meist noch lebend, verdicken sich aber dann stärker, oft bis zum Schwinden des Lumens. Die Stümpfe gehen dann durch äußere Einwirkungen verloren, oder das Tragorgan schließt sich gegen sie ab.

Zum Abschluß sei noch die Funktion der kurzlebigen Haare hervorgehoben. Schon 1827 beobachtete De Candolle, daß ein starker Haarbesatz als Transpirationsschutz wirke. Aber erst gegen Ende des 19. Jh. finden sich darüber bei Haberlandt, Wiesner, Keller u. a. nähere Angaben. Seybold gab 1931 eine physikalische Erklärung der Transpirationseinschränkung.

Auf der spaltöffnungsfreien Oberseite wirken dicht stehende Haare als Insolationsschutz, der, wie Wiesner 1867 hervorhebt, besonders bei jenen Pflanzen nötig ist, die, ohne Faltung oder Aufrollung aus der Knospenlage hervortretend, gleich ihre Oberseite dem Licht darbieten. Auch Keller vertritt 1891 die Meinung, daß mit der naturgemäßen Schutzlosigkeit der unentwickelten Organe bei vorhandenem Schutzbedürfnis in den weitaus meisten Fällen das Auftreten einer Haarbekleidung in Verbindung steht.

Baumert zeigte 1909 an Hand von Versuchen, daß durch eine dichte Haarbekleidung auch die Erwärmung durch Insolation herabgesetzt wird.

Tote Haare können aber auch noch zu anderen Aufgaben dienen. So handelt es sich bei den haarförmigen Flugorganen immer um abgestorbene lufterfüllte Haare. Sie sterben meist lange vor der Flugbereitschaft der Samen und Früchte, die mit ihnen ausgestattet sind, ab. An jungen Pflanzenteilen sollen dichte Haarfilzbildungen auch einen Druck- und Reibungsschutz darstellen.

II. Material und Methode

Mein Ziel war es, anatomische und physiologische Betrachtungsweisen zu verknüpfen und ein Bild des Lebensablaufes einiger Trichome zu geben. Ich habe mehrere Arten untersucht und wähle daraus für die vorliegende Arbeit die Büschelhaare von *Phlomis fruticosa* und *Viburnum lantana*. Das Pflanzenmaterial stammte aus dem Versuchsgarten „Augarten“ (*Phlomis fruticosa*) und aus dem Botanischen Garten am Rennweg (*Viburnum lantana*).

Um die äußere Gestalt der Haare in den verschiedenen Entwicklungsstadien zu beschreiben, wurden Blattquerschnitte untersucht und zeichnerisch festgehalten. Die Mannigfaltigkeit der Plasmazustände wurde in verschiedenen Untersuchungsmedien betrachtet. Die physiologisch bedingten Degenerationserscheinungen traten dabei besonders deutlich bei einer vergleichenden Beobachtung in Wasser (Aqua dest.) und in einer 0,6 molaren Lösung von Kaliumchlorid hervor. Bei *Phlomis fruticosa* wurde auch noch eine einmolare Traubenzuckerlösung und reines Paraffinöl für diese vergleichenden Untersuchungen herangezogen.

Die Arbeit wurde in den Jahren 1950/51 im Versuchsgarten „Augarten“ des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien durchgeführt. Es sei mir gestattet, dem Vorstand des Institutes, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. K. Höfler, für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine stete Hilfsbereitschaft meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Dozenten Schindler, dem Leiter des Versuchsgartens, für wertvolle Unterstützung sowie für den Hinweis auf *Phlomis fruticosa*.

III. *Phlomis fruticosa*

Phlomis fruticosa ist von einem dichten weißlichen Filz büschelförmiger Haare bedeckt. Diese wurden schon 1745 von Guettard aufgefunden, der für alle *Phlomis*-Arten mit Ausnahme einer einzigen (la *Phlomis d'Orient* à feuilles d'écoupées) „Zwischenknopphaare“ (Filets à goupillons) angibt. Er beschreibt sie als faden- oder kegelförmige Haare mit kugelligen Knoten, worauf wegstehende Haare gepflanzt sind. — Von E. Weiß (1867) werden die sich verfilzenden Haare von *Phlomis* unter die Büschelhaare gereiht.

Aus meinen Stengel- und Blattuntersuchungen konnte ich ersehen, daß es sich bei diesem Haarfilz nicht um einen feststehenden Haartyp handelt, sondern daß gleitend alle Übergänge vom einzellreihigen Haar bis zum Büschelhaar vorkommen. Die Übergangsformen (Abb. 1 a) treten besonders auf der etwas eingewölbten Innenseite der Blattstiele auf, während die langstieligen typischen Büschelhaare auf der Außenseite des Blattstieles sowie am Stamm zu finden sind (Abb. 1 b u. c). Sie können Längen bis zu 1,5 mm erreichen. Ihre langen, zweizellreihigen Stiele, deren Zellreihen oft etwas übereinandergeschoben sind, tragen 5—11 meist einzellige Büschelzellen. Auch auf den Blättern finden sich typische Büschelhaare, die hier aber bedeutend kürzer sind. Im Minimalfall kann ihr Stiel aus zwei nebeneinanderliegenden Zellen bestehen, die ein zwei- bis fünfzelliges Büschel tragen. Diese Büschelhaare leiten zu einer Haarform über, bei der nur eine Büschelzelle auf einer verbreiterten Basalzelle aufsitzt. Solche Haare sind selten und finden sich nur am Blattgewebe zwischen den Nervensträngen.

Neben diesen Deckhaaren finden sich auch Köpfchenhaare, die meist aus einem ein- bis zweizelligen, kugelig aufgeschwollenen Köpfchen und einem einzellreihigen Stiel bestehen. Zwischen den Büschelhaaren und den Köpfchenhaaren lassen sich manchmal Übergänge auffinden, indem z. B. ein Ast eines Büschelhaares in einem Köpfchen endet.

Über die Haarentwicklung bei einigen *Phlomis*-Arten arbeitete Hirsch (1899). Von ihm wird aber nur die akropetale Entwicklung einiger Borstenhaare angegeben. Die Büschelhaare fanden bei ihm keine Erwähnung.

Nach meinen Beobachtungen entwickeln sie sich basipetal, d. h. die erstgebildete ältere Querwand bleibt die der Haarspitze nächstgelegene und die

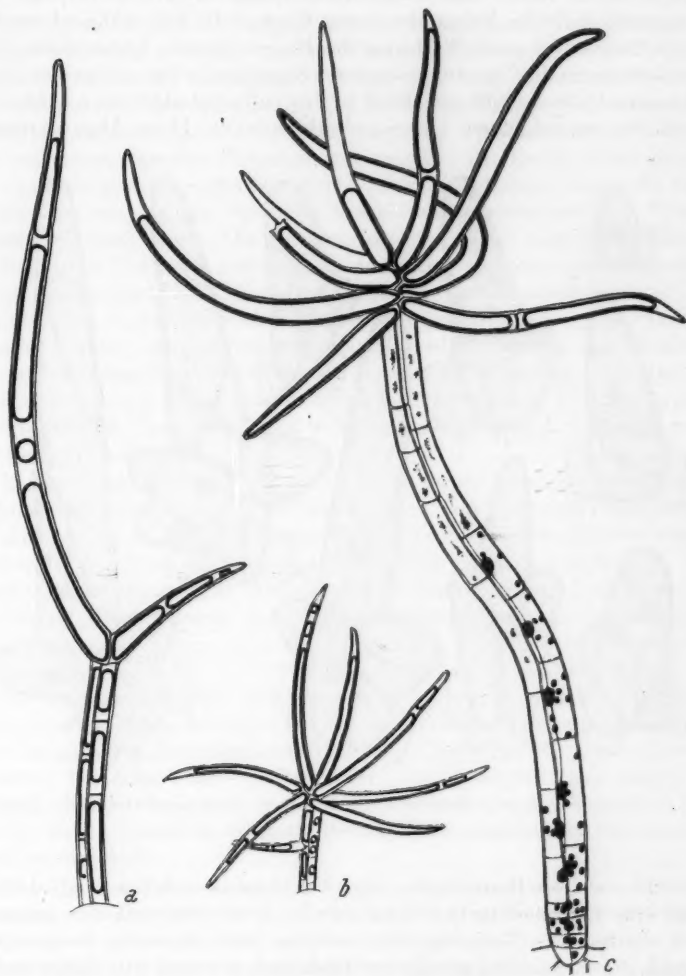


Abb. 1. *Phlomis fruticosa*. Haarformen. a) Übergangsform, luftgefüllt; b) Büschelhaar des Blattes, luftgefüllt; c) Büschelhaar des Stammes: Büschelzellen tot, z. T. luftgefüllt, basale Stielzellen noch lebend.

späteren Zellen werden sukzessiv von der Basalzelle geliefert. Die jeweils jüngste Querwand bildet daher die Decke der Basalzelle. — Die **Haarentwicklung** beginnt mit einer blasenartigen Vorwölbung einer Epidermis-

zelle, die zu einer einzelligen Papille heranwächst (Abb. 2 a). Danach wird in Epidermishöhe eine Querwand angelegt, so daß ein zweizelliges Gebilde entsteht, dessen Zellen sich etwas in die Länge strecken (Abb. 2 b). Die Spitzenzelle stellt die Anlage der ersten Büschelzelle dar, während von der basalen Zelle das weitere Wachstum des Haares ausgeht. Diese basale Zelle entwickelt gegen die Trennungswand zur Spitzenzelle hin ein bis zwei Ausbuchtungen (Abb. 2 c), die sich durch je eine Zellwand abgliedern (Abb. 2 d), die auf der erstgebildeten Querwand schräg steht. Diese Abgliederungen

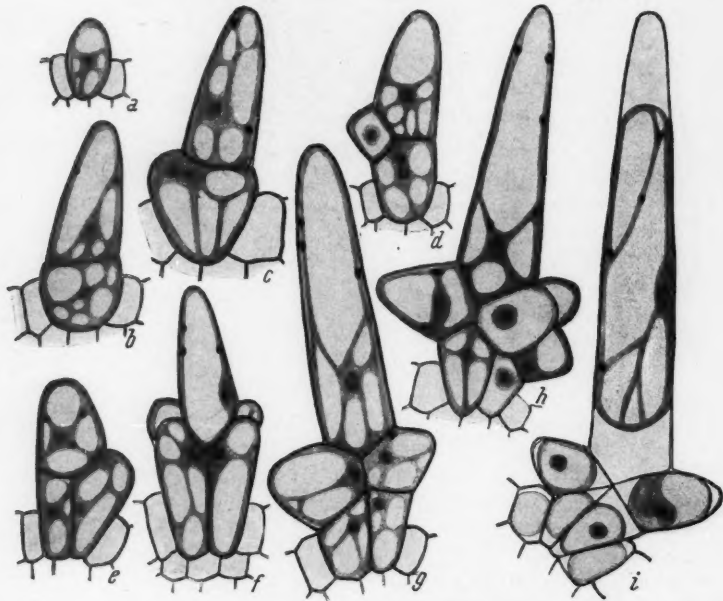


Abb. 2. *Phlomis fruticosa*. Haarentwicklung. a—h) aufeinanderfolgende Jugendstadien; i) Plasmolyse in 0,6 molarem KCl.

stellen zwei weitere Büschelzellen dar. Vor einer neuerlichen Abgliederung erfolgt eine Längsteilung der Basalzelle in zwei nebeneinander gelegene Zellen, die nun die Neuanlage von weiteren Ausbuchtungen übernehmen, während die bereits abgegliederten Büschelzellen einem Streckungswachstum unterliegen (Abb. 2 f u. g). Dabei zeichnet sich die erstgebildete Büschelzelle durch ihren Vorsprung im Wachstum aus.

Während dieser Entwicklungsschritte kommt es aber öfter zu Unregelmäßigkeiten, indem nämlich schon vor der Abtrennung der beiden erstgebildeten Büschelzellenanlagen die basale Zelle durch eine Längswand zerteilt werden kann (Abb. 2 e). Jedoch tritt die Längswand niemals später auf als nach Abtrennung der dritten (sehr selten der vierten) Büschelzelle.

Ist die Anlage sämtlicher Büschelzellen beendet, so ist damit das Jugendstadium des Haares abgeschlossen. Es folgt das Wachstumsstadium, das mit den lebenden, voll erwachsenen Zellen abschließt.

Die jugendlichen Zellen zeigen mehrere kleine, durch Plasmastränge getrennte Vakuolen und einen in einer Plasmaumhüllung liegenden Zellkern. Selten treten deutlich erkennbare Plastiden auf; Kristalle fehlen überhaupt. Mit beginnendem Streckungswachstum fließen die Vakuolen zusammen und die große vollerwachsene Zelle (Abb. 3 a) zeigt eine einheitliche Vakuole, die von einem schmalen Plasmamantel umgeben ist. Durch diesen werden die nunmehr reichlich vorhandenen Plastiden der Zellwand angepreßt, ebenso der Kern, den man nur durch das Auftreten eines etwas größeren Plasmahügels erkennen kann. Die Kernumrisse sind dabei nicht auszunehmen, höchstens der Nukleolus zeichnet sich durch eine ganz schwach unterschiedliche Lichtbrechung aus. In vielen Fällen ist eine Plasmaströmung zu erkennen. Die Strömungsgeschwindigkeit beträgt ca. $5 \mu/\text{sec}$. Die Plastiden werden von der Strömung im allgemeinen nicht mitgerissen, nur ab und zu findet die Verlagerung einer Plastide um eine kurze Strecke statt. Im Zellsaft vieler dieser Zellen finden sich kleine rechteckige Kristallplättchen, manchmal auch kleine Kügelchen in lebhafter BMB. Die Kriställchen treten oft stark gehäuft auf.

Bei der Untersuchung in Wasser tritt in diesen lebenden Zellen leichte Vakuolenkontraktion ein. Die Vakuole hebt sich von der Zellspitze ab, wobei dort leicht körniges, oft von Vakuolen durchsetztes Plasma zurückbleibt. In Paraffinöl zeigt sich das gleiche Bild, nur tritt hier noch die Tendenz zu häufchenartigen Ansammlungen der Plastiden auf; besonders systrophe Ansammlungen sind zu verzeichnen. In 0,6 molarem KCl ließen sich schön konvex abgerundete Teilprotoplasten erkennen, die eine deutliche Kontur aufwiesen (Abb. 2 i u. 4 a). Der randliche Plasmabelag, der die Plastiden der Wand anpreßte, ließ sich auch hier erkennen, und bei Vorhandensein von Kriställchen bewegten sich diese in lebhafter Bewegung im Zellsaft. Die Plasmolyse ist reversibel; es kann eine vollständige Rückdehnung erzielt werden. Bei neuerlicher Erhöhung der Lösungskonzentration zeigen sich wieder stark konturierte konvexe Teilprotoplasten. — In Neutralrot färbt sich in diesen Zellen die Vakuole rot an, wobei eine leichte Vakuolenkontraktion stattfindet.

Hat die Zelle ihre endgültige Größe erreicht, so setzt der **Absterbevorgang** ein. Die Nekrose tritt dabei nicht in allen Haarzellen gleichzeitig auf, sondern sie richtet sich nach dem Alter der Zelle. Sie beginnt in der ältesten Zelle des Büschels, setzt sich dann über alle Büschelzellen hin fort, während der Haarstiel noch lebhaftes Wachstum zeigt. Nach dem Tod der Büschelzellen beginnt der Absterbevorgang in den obersten Stielzellen, greift von dort aus auf die unteren über und endet in den basalen Zellen des Stieles.

Der Absterbevorgang wurde in den Büschelzellen untersucht. Es ließen sich dabei im Nekrosegesehen charakteristische, immer wiederkehrende Stadien verfolgen, die allerdings durch mannigfache Übergänge miteinander verbunden waren.

Vor Einsetzen der Desorganisation im Plasma tritt eine Schädigung der Plastiden auf. Diese ist durch Quellung und Vakuolisierung der Plastiden gekennzeichnet. Dabei entsteht entweder eine mittelgroße Vakuole in der Plastidenmitte, die von einem verhältnismäßig breiten grünen Pla-



Abb. 5. *Phlomis fruticosa*. Nekrose, untersucht in Wasser. a) lebende voll erwachsene Zelle; b) Degeneration der Plastiden, leichte Fällungen im Plasma; c) Quellung des Plasmabelages, stärkere Fällungserscheinungen; d) unregelmäßige Abhebung des Protoplasten von den Längswänden; e) die Wandungen der sich kontrahierenden Vakuole treten hervor; f) sehr fortgeschrittene Nekrose: Vakuolisierung des Protoplasmas; g) Vakuolenreste und totes Plasma; h, i) Zellinhalt im Schwenden; k—m) Luftfüllung des toten Haares.

stidenanteil umgeben ist, oder es tritt eine große Vakuole auf, die von einem schmalen, unregelmäßig breiten Bereich grüner Plastidensubstanz umrandet wird, an manchen Stellen nur von der Plastidenhaut. Oder es finden sich mehrere kleine Vakuolen, zwischen denen grüne tropfige Anteile aufscheinen.

Charakteristisch für diese Veränderungen ist es, daß immer nur eine je Zelle auftritt.

Sehr rasch nach dem Beginn der Desorganisation in den Plastiden tritt der Vorgang der Quellung im Plasma auf und ist in Wasser und in Paraffinöl sehr gut zu beobachten. Dabei fällt ein leichter körniger Niederschlag aus (Abb. 3b). Am Kern, der als letzter von der Desorganisation ergriffen wird, zeigt sich im Anfangsstadium der Plasmaquellung noch keine Veränderung. Er ist noch immer nur durch einen stärkeren Plasmahügel in seiner Lage zu erkennen; seine Konturen sind nicht sichtbar. Im Zellsaft dauert die BMB, kenntlich durch die Bewegung der hier auftretenden Kri-

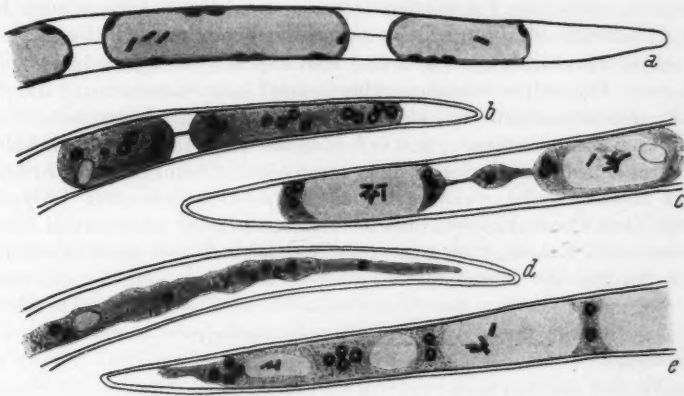


Abb. 4. *Phlomis fruticosa*. Nekrose, untersucht in 0,6 molarem KCl. a) normale Plasmolyse, Teilprotoplasten sind stark konturiert; b) beginnende Nekrose, Teilprotoplasten zeigen zarte Konturen; c) weiteres Stadium: ein der Kappenplasmolyse ähnliches Bild; d) Protoplast hebt sich auch von den Längswänden unregelmäßig ab; e) spätes Stadium: Tonoplastenplasmolyse.

stallplättchen und Körnchen, an. An der Zellspitze ist in diesem Zustand noch leichte Vakuolenkontraktion zu beobachten.

Untersucht man die Zellen in KCl, so ist im Anfangsstadium der Quellung, gleichsam als Übergang vom normalen Plasmolysebild, ein rasch ablaufendes Stadium zu beobachten, das eine auf den ersten Blick normal aussehende Plasmolyse ergibt. Die Teilprotoplasten sind wieder schön konvex abgerundet, ihre Konturen aber meist nur mehr als mittelstark zu bezeichnen. Die Plastiden sind gequollen und leicht vakuolisiert. Eine Deplasmolyse läßt sich mühelos erreichen; es findet jedoch beim neuerlichen Durchsaugen von KCl 0,6 mol keine Reaktion mehr statt. Bei etwas fortgeschrittener Quellung des Plasmas zeigt sich in KCl eine Plasmolyse mit zartkonturiertem Protoplasten (Abb. 4b). Die Teilprotoplasten sind wieder konvex gestaltet, ihre Umrisse aber nur mehr schwach sichtbar. Die vakuolisierten und gequollenen Plastiden sind nicht mehr so

extrem der Wand angepreßt. Im Plasma finden sich leichte Niederschläge. Manchmal ist auch an einigen Plasmastellen BMB zu beobachten, die — allerdings selten — auch auf die Plastiden übergehen kann. Im Zellsaft zeigt sich, wenn Kristallplättchen oder sonstige Inhomogenitäten eine Beobachtung zulassen, ebenfalls BMB. Der Kern quillt in KCl auf und verwandelt sich in eine optisch homogene Blase mit deutlicher Kontur. (Letzteres gilt auch für die folgenden in KCl untersuchten Stadien.)

Versucht man nach KCl-Behandlung zu deplasmolysieren, so dehnen sich die Teilprotoplasten aus, fusionieren und zeigen das Bild einer geschädigten Zelle mit leichten Plasmaniederschlägen und vakuolisierten Plastiden. In einem fortgeschrittenen Stadium ist dieses Deplasmolysebild nicht stabil, sondern es tritt eine Vakuolenkontraktion in mehrere Teilvakuolen ein. Nach KCl-Zugabe ergibt sich keine neuerliche Veränderung mehr.

Auch in Traubenzucker (1,0 molar) läßt sich die oben geschilderte zartkonturierte Plasmolyse erreichen. Hier erfolgt nach Herabsetzung der Lösungskonzentration keine Wiederausdehnung der schwach konturierten Teilprotoplasten, sondern diese zeigen verschiedenes Verhalten: Manche behalten ihre Form bei, die sie in der Lösung mit stärkerer Traubenzucker-Konzentration besessen haben, andere bekommen an den konvexen Teilprotoplastenenden Plasmakappen, manche Teilprotoplasten platzen und lassen ein verstreutes Koagulat zurück. — In Neutralrot lassen die Vakuolen in frühen Stadien der Plasmaquellung einen leicht rosa Anflug erkennen. In den weiteren Stadien des Absterbe geschehens findet keine Anfärbung der Vakuole mehr statt. Auch die toten Plasmamassen zeigen keine rote Anfärbung.

Im Verlauf der fortschreitenden Quellung (Abb. 5 c) im Plasma erreicht der Plasmabelag eine Dicke, die dem Durchmesser der aus ihrer an die Wand gepreßten Stellung herausgetretenen vakuolisierten Plastiden entspricht. Der Kern tritt durch Sichtbarwerden seiner Konturen hervor; er beginnt leicht zu quellen unter Ausbildung feiner Niederschläge (winziger Vakuolen?) in seinem Inneren. Auch jetzt tritt an der Zellspitze noch leichte Vakuolenkontraktion ein. In Paraffinöl verändert sich dieses Bild kurz nach dem Einlegen, indem sich der Protoplast in konvex abgerundete Teilstücke zerlegt, die aber bald zusammenschrumpfen und einen zerrissenen, völlig denaturierten Plasmaschlauch zurücklassen.

In KCl treten in ganz frühen Übergangsstadien schwach konturierte Teilprotoplasten auf, deren konvex abgerundete Enden durch stärkere Niederschläge hervortreten. Dieses Zwischenstadium wird aber sehr bald von einer der Kappenplasmolyse vergleichbaren Plasmolyseform abgelöst (Abb. 4 c). Sofort nach dem Einlegen beobachtet, läßt sich ein gequollener Plasmabelag feststellen, in dem die vakuolisierten Plastiden eingebettet liegen. Der zuerst schwach hervortretende Kern quillt zu einer optisch homogenen Blase. Ein leichtes Abheben des Plasmaschlaches in gleichmäßig welliger Form erfolgt von der gesamten Längswand. An den stärker eingedellten Stellen geht die Verschmälerung weiter, während sich der Protoplast an den Stellen schwächerer Abhebung der Zellwand wieder an-

legt, so daß sich das Bild einer Plasmolyse mit auslaufender konvexer Ab-
rundung ergibt. Die Teilprotoplasten formen sich dann schön konvex her-
aus, stehen aber meist mit Plasmabrücken untereinander in Verbindung.
Sie zeigen im Inneren eine große Vakuole, in der sich, wenn vorhanden,
Kriställchen in BMB hin und her bewegen. An den konvexen Enden findet
sich eine gequollene Plasmakappe mit leicht körnigem Plasma und den
vakuolisierten Plastiden. In diesen Kappen ist manchmal BMB zu beob-
achten. Nicht immer sammelt sich das ganze Plasma in den Kappen, sondern
es können auch zwischen Vakuole und Zellwand Plasmareste, sogar mit
Plastiden, zurückbleiben. Die Konturen der Teilprotoplasten sind schwach.

Hatte in den oben geschilderten Übergangsformen bei Deplasmolyse
noch ein Zusammenfließen der Vakuolen stattgefunden, so ist dies hier nicht
mehr der Fall. Die Vakuolen nehmen Wasser auf, dehnen sich aus, erhalten
sich aber getrennt. Beim Zusammenstoßen zweier sich ausdehnender Teil-
protoplasten fließen nur die Plasmakappen zusammen. Es entsteht ein Bild,
das mit einer starken Vakuolenkontraktion bei der Untersuchung in Wasser
vergleichbar ist. Das zwischen den Vakuolen liegende Plasma ist leicht
vakuolisiert und enthält die Plastiden. Bei neuerlicher Zugabe von KCl
läßt sich keine Veränderung mehr erzielen. — In Traubenzucker ist der
gleiche Vorgang zu beobachten, nur ist die Intensität der feinen körnigen
Niederschläge in den Plasmakappen weniger stark als in KCl. Auch hier
fließen bei Deplasmolyse nur die Kappen zusammen, während die dazwi-
schenliegenden Zellsaftvakuolen erhalten bleiben.

Im folgenden Nekrosebild, das in allen vier Untersuchungsflüssigkeiten
das gleiche Aussehen hat, finden sich im Protoplasma leichte Niederschläge
und die vakuolisierten Plastiden. Der Zellkern ist gequollen. Die dem Zell-
saft angehörigen Kristallplättchen und die kleinen Körnchen bewegen sich
in lebhafter BMB. Bei längerem Liegen in Wasser — in Paraffinöl, KCl und
Traubenzucker dagegen spontan — findet ein leichtes, unregelmäßiges
Abheben des Protoplasten von der Zellwand statt (Abb. 3 d u. 4 d).
Stärkeren formverändernden Einflüssen ist der Protoplast nicht mehr zu-
gänglich.

Als Übergang zum nächstfolgenden Stadium differenzieren sich in KCl
und Traubenzucker innerhalb des Protoplasten zellsaftreichere und zell-
saftärmere Partien heraus. Im leicht zusammengezogenen Protoplasten tre-
ten schwach sichtbare Vakuolen auf.

Mit dem Fortschreiten der Degeneration zeigt sich knapp nach dem Ein-
legen in Wasser oder Paraffinöl eine lebhafte Bewegung in der Zelle. Die
Vakuole tritt aber nicht nur von der Zellspitze zurück, sondern sie zerfällt
in mehrere konvex abgerundete Teilvakuolen, die die ganze Zellbreite ein-
nehmen und das geschädigte Plasma zwischen sich zusammenschieben
(Abb. 5 e). Dieses Plasma hat noch seine Flüssigkeitsnatur bewahrt, wie
die in ihm stattfindende BMB zeigt. Im Plasma eingelagert finden sich die
degenerierenden Plastiden. Auch im Zellsaft dauert die BMB an. In einigen
dieser Zellen mit Vakuolenkontraktion hebt sich das zwischen den Va-
kuolen eingeschobene Plasma leicht von der Zellwand ab.

In KCl und Traubenzucker findet analog zur Vakuolenkontraktion Tonoplastenplasmolyse (Abb. 4 c) statt. Hier treten ebenfalls mehrere Teilvakuolen in konvexer Form auf, die entweder die ganze Zellbreite einnehmen oder noch von einem schmäleren bis breiteren Plasmabelag umgeben werden. Das Plasma ist körnig, zeigt an manchen Stellen aber noch BMB. Die Plastiden sind nach wie vor vakuolisiert. In Traubenzucker fand sich, wenngleich viel seltener, auch eine andere Form der Tonoplastenplasmolyse, die der Vakuolenkontraktion, wie sie in Wasser erfolgt, stark ähnlich war. Hier erschien das zwischen den Vakuolen zusammengedrückte Plasma fast klar. Bei Herabsetzung der Lösungskonzentration ergaben sich sowohl in Traubenzucker als auch in KCl keine Veränderungen.

Die folgenden Stadien des Nekrosevorganges finden sich in allen Untersuchungsfüssigkeiten in gleicher Ausbildung. Sie werden eingeleitet durch die Vakuolisierung des Plasmas (Abb. 5 f). In diesem Stadium zerfällt die Vakuole in mehrere größere Teilvakuolen, in denen, an Kriställchen erkennbar, lebhafte BMB zu beobachten ist. Das Protoplasma legt sich den konvexen Enden dieser Teilvakuolen an und ist stark vakuolisiert. Dem Plasma eingelagert finden sich die ebenfalls vakuolisierten Plastiden und der gequollene, Ansätze zu einer Vakuolisierung zeigende Kern. Eine BMB ist im Plasma nicht mehr zu beobachten.

Die Flüssigkeitsnatur des Plasmas, die am Anfang dieses Stadiums (siehe Umließen der konvexen Teilvakuolen) noch vorhanden war, erlischt langsam, so daß man im nächsten Stadium des Desorganisationsvorganges von einer Fixierung des Plasmas (Abb. 5 g) sprechen kann. Die kleiner werdenden, allmählich verschwindenden Zellsaftvakuolen werden nun vom Plasma nicht mehr umflossen. Der Plasmaschlauch ist gerissen und das Plasma sieht zusammengefallen, feinschaumig-struiert aus. Die Plastiden erscheinen geschrumpft.

Mit dem völligen Verschwinden der Zellsaftvakuolen fallen die Plasmateilchen ganz zu körnigen fixierten Resten zusammen, innerhalb derer sich kleine grüne, durch den Zerfall der Plastiden hervorgegangene Reste beobachten lassen. Außerhalb des fixierten Plasmas ist im Zellsaft BMB zu verzeichnen. Aber auch die häufchenförmigen Plasmareste zerbröckeln und werden aufgelöst, so daß der sichtbare Zellinhalt immer geringer wird (Abb. 5 h u. i). Der Kern ist noch erhalten; er ist stark (manchmal schwächer) vakuolisiert und zerfällt erst nach dem Verschwinden aller plasmatischen Reste. Außerdem finden sich in der Zelle noch Kristallplättchen oder kleine grüne Kügelchen vor, an denen manchmal noch BMB (Zellsaft) zu beobachten ist. Schließlich erlischt aber auch diese und die Kriställchen sammeln sich in einem Häufchen in der Zelle an. Dieses Häufchen bleibt nach Verschwinden des Kernes noch etwas erhalten, fällt aber schließlich auch der Auflösung anheim. Das Zellumen erscheint optisch leer.

Nun tritt die endgültige Ausgestaltung der Zelle, die Luftfüllung ein (Abb. 5 k—m). Zuerst bildet sich ein kleines Luftbläschen im basalen, etwas erweiterten Teil der Zelle (Büschelzelle). Es vergrößert sich dann, nimmt den ganzen Basalteil ein, teilt sich aber nach Erreichen einer bestimmten Größe, so daß sich nun eine größere Luftblase im Mittelteil der

Zelle und eine kleinere, ständig wachsende, im Basalteil befindet. Je nach der Länge der Zelle können sich zwei, drei und mehr längliche Luftblasen im Lumen ansammeln. Diese vereinigen sich dann zu einer einzigen Luftblase, die vorerst noch die Zellspitze frei läßt. Wird jedoch auch diese von Luft erfüllt, so ist damit ein endgültiger Zustand der Zelle erreicht.

Nach Füllen der Büschelzellen mit Luft (der endgültige Zustand tritt, ebenso wie das erste Auftreten von Luftblasen, nicht in allen Büschelzellen zur gleichen Zeit ein, jedoch ist dieser Unterschied geringfügig) beginnt die Luftfüllung im Haarstiel. Hier tritt sie im oberen Zellteil der obersten Zellen zuerst ein und setzt sich dann langsam gegen die Basis hin fort. Die Haare bleiben im völlig luftgefüllten Zustand auf den alten Pflanzenteilen erhalten.

Als Abnormität tritt manchmal eine degenerative Wandverdickung der Büschelzellen auf. Die Membranen zeigen dann gegen das Lumen zu Vorsprünge, die bis zu einer Durchwachsung des Lumens führen können. Diese letzterwähnten Vorgänge sind jedoch äußerst selten.

Zur Veranschaulichung der **Lebensdauer** und des **Wachstumsrhythmus** der Haare wurde ein beblätterter Stamm untersucht. Die Blätter sind im nachstehenden Protokollauszug nach dem Stand ihrer Entwicklung numeriert, wobei mit 1 das älteste Blatt, mit 4 die jüngste ohne weitere Präparation sichtbare Blattanlage bezeichnet wird. (Es befinden sich immer zwei Blätter im selben Entwicklungszustand: von ihnen wird nur eines bezeichnet und beschrieben.)

Um Wiederholungen zu vermeiden, seien einige allgemeine, den Haarbesatz betreffende Bemerkungen für die Blätter 1—3 herausgehoben: Es lassen sich Unterschiede zwischen der Behaarung der oberen und unteren Epidermis erkennen. So ist z. B. die Behaarungsdichte auf der Blattunterseite bedeutend stärker. Hier bedeckt ein weiß erscheinender Haarfilz die stark hervortretenden Blattnerven; in den Alveolen ist der Haarbesatz spärlicher. Auf der Blattoberseite findet man dagegen die hier nicht stark vortretenden Blattnerven nur von einigen Köpfchenhaaren besetzt, während sich die Büschelhaare über die Alveolen verteilen. Auch in bezug auf die Haargröße zeigen sich Unterschiede: Während auf der oberen Blattepidermis die Haare mit kleinen Büschelzellen vorherrschen, die meist mit zwei Zellen der Epidermis aufsitzen, finden sich auf der Blattunterseite vorwiegend Haare mit großen, langgestreckten Büschelzellen und längeren Stielen vor. Allerdings nimmt auf der Blattunterseite von der Basis gegen die Blattspitze zu vorwärtsschreitend die Zellgröße und Stiellänge ab. — Köpfchenhaare finden sich auf allen drei Entwicklungsstufen des Blattes in allen Übergängen vom Jugendstadium bis zum abgestorbenen Haar vor.

Auf der unteren Blattepidermis von Blatt 1 (83 mm Mittelnervlänge) zeigen fast alle Büschelzellen Luftfüllung. Die oberen Stielzellen sind meist abgestorben, während die unteren noch Lebensreaktion geben. An den Büschelhaaren der Blattoberseite finden sich jene Zellen vorherrschend, die kleine Inhaltsreste in sonst leer erscheinenden Lumina aufweisen. Viele Büschelzellen zeigen mehr oder weniger fortgeschrittene Luftfüllung. Vereinzelt treten auch noch lebende Büschelhaare auf. — Jugendstadien fehlen vollkommen.

Die Blattunterseite von Blatt 2 (72 mm) trägt vorwiegend Haare mit luftgefüllten Büschelzellen, jedoch finden sich auch späte Nekrosen. Von den Stielen zeigen nur besonders lange in den oberen Zellen beginnende Luftfüllung. Die übrigen Stiele weisen gegen das Zellbüschel hin Nekrosen, basal jedoch lebende Zellen auf. Die Blattoberseite trägt Haare mit meist frühen Nekrosen, aber auch lebende Haare. Auch auf Blatt 2 treten keine Jugendstadien mehr auf.

Die langgestielten Haare der Blattunterseite von Blatt 3 (40 mm) lassen nur selten luftegefüllte Zellen beobachten. Dagegen finden sich in den Büschelzellen alle Nekrorestadien vor; die Stiele sind größtenteils lebend. Es treten auch vollkommen lebende Haare auf. — Auf der Blattoberseite zeigen sich neben allen Nekrorestadien auch späte Wachstumsstadien. Jugendliche Haare lassen sich jedoch weder hier noch auf der unteren Epidermis auffinden.

In der mit 4 bezeichneten Blattknospe (14 mm) waren die beiden Blättchen noch zusammengerollt. Die mikroskopische Betrachtung zeigte wieder auf der inneren (oberen) Blattepidermis kürzere Haare als auf der äußeren (unteren). Es sind schon gestielte Büschelhaare vorhanden, jedoch finden sich diese nur auf der äußeren Epidermis, besonders auf der Mittelrippe. Neben diesen am weitesten in der Entwicklung fortgeschrittenen Haaren zeigen sich auf äußerer und innerer Epidermis alle Entwicklungsstufen bis zu den reichlich vorhandenen Jugendstadien.

Im folgenden seien die von den Blättchen 4 umschlossenen Blattanlagen von 3,8 mm, 1,4 mm, $217\ \mu$ und $175\ \mu$ betrachtet. Die Blattinnenseite der größten dieser Blattknospen ist spärlicher behaart und mit jüngeren Stadien besetzt als die äußere Blattfläche. Hier zeigen sich bereits Nekrorestadien neben den im Wachstum begriffenen lebenden Haaren. Ferner finden sich alle Übergänge bis zu ganz frühen Jugendstadien.

Bei der Blattanlage von 1,4 mm Mittelnervlänge zeigt sich die Behaarung der äußeren Epidermis nur längs eines um die Mittelrippe hinziehenden Bereiches. In diesem ist die Behaarungsdichte an der Blattspitze am größten und wird gegen die Basis zu immer schwächer, bis schließlich nach einer Zone von Köpfchenhaaren keine Haaransätze mehr auftreten. An der Blattspitze finden sich schon einige Wachstumsstadien, während weiter nach unten zu nur mehr Jugendstadien vorkommen. — Die innere Epidermis trägt nur acht Köpfchenhaare in der Blattmitte und randgenähert an der Spitze des Blättchens drei Büschelhaare.

Die zwei weiteren Blattanlagen von $217\ \mu$ und $175\ \mu$ zeigten keinerlei Haaransätze.

Ergebnis der Blattuntersuchungen: Der Beginn der Haarentwicklung zeigt sich auf ganz jungen Blattanlagen (bei der Untersuchung einer anderen Knospe fand ich an der Spitze eines $350\ \mu$ großen Blättchens zwei Haaranlagen). Die Haare treten zuerst an der Blattspitze auf, ziehen sich dann auf der Blattaußenseite in einem um die Mittelrippe gelegenen Bereich gegen die Basis hinunter. Nun erst werden auf der Blattinnenseite Haare angelegt; diese sind infolge ihrer späteren Anlage schon von den kleinsten Blättchen an gegenüber den Haaren der Außenepidermis in der Entwicklung zurück. Es treten hier zuerst Köpfchenhaare auf, die in der Blattmitte erscheinen, danach folgen Büschelhaare, die der Blattspitze zu angelegt werden. Auf der Blattaußenseite gehen inzwischen weitere Haaranlagen, dem Blattrand zu, vor sich. Zuletzt wird der Haarbesatz an der Basis angelegt. Auch auf der Blattinnenseite schreitet die Haarentwicklung voran.

Infolge der weiteren Anlage von Jugendstadien zwischen den schon älteren Haaren behalten die Blättchen trotz des Flächenwachstums ihre dichte Haarbedeckung bei. Die Anlage von Jugendstadien findet auch noch nach Entfaltung des Blattes statt, wird aber immer spärlicher und zuletzt ganz eingestellt, so daß z. B. auf einem Blättchen von 40 mm Mittelnervlänge keine Jugendstadien mehr zu finden waren. Nun geht nur mehr ein weiteres

Wachstum und eine Entwicklung bis zum stabilen Zustand der Luftfüllung in den Haaren vor sich. Dadurch rücken die Haare mit dem weiteren Flächenwachstum der Blättchen immer weiter auseinander. So sah man auf Blatt 3 im Auflicht die Epidermis nur durchschimmern, während sie auf Blatt 1 bereits einer deutlichen Beobachtung zugänglich war. Jedoch sind die Haare so dicht angelegt worden, daß auch auf ganz großen Blättern die Blattadern der Unterseite eine weißlich erscheinende Filzbedeckung erkennen lassen.

Um über die **Lebensdauer der Haare** nähere Aufschlüsse zu bekommen, führte ich im April 1951 folgende Versuche durch. Von den beiden, an gegenüberliegenden Blattachsen entspringenden Seitentrieben, die zirka gleiches Alter hatten, wurde einer untersucht, der andere um eine bestimmte Anzahl von Tagen später. Der vorgerückte Entwicklungszustand der Haare an den später untersuchten Blattanlagen ließ einen Schluß auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der Haare zu.

So waren z. B. binnen 9 Tagen einfache Epidermisausstülpungen zu Jugendstadien herangewachsen, während sie sich nach 3 Wochen zu späten Wachstumsstadien entwickelt hatten. Jugendstadien waren nach 3 Wochen in frühe Nekrotestadien (bis Vakuolenkontraktion) übergegangen, während Haarzellen des vorgeschrittenen Wachstumsstadiums nach 3 Wochen bereits Luftfüllung zeigten.

Es ist also anzunehmen, daß die Haare etwa 6 Wochen nach ihrer Anlage in das Stadium der Luftfüllung treten, das dann je nach der Länge des Haarstieles kürzere oder längere Zeit in Anspruch nimmt.

IV. *Viburnum lantana*

Die Haare von *Viburnum* waren schon Guettard (VI. Abh. 1750) bekannt, der sie unter die Gruppe Filets en houpe stellte und auch napfförmige Köpfchenhaare angab. Von Schrank (1789—1792) wurde der Haarfilz von *Viburnum lantana* den Haarwarzen zugerechnet, die er als warzenförmige Erhebungen mit einigen wegstehenden Haaren beschreibt. Weiß gliederte sie 1867 den Büschelhaaren zu. In Solereder's Übersicht über die *Caprifoliaceen*-Behaarung werden für *Viburnum*-Arten Drüsen- und Deckhaare angegeben, von letzteren einzellreihige Haare, Büschel- und Baumhaare sowie Schildhaare.

Über die Lebensdauer der Büschelhaare finden sich bei Weiß (1867) und Burkhardt (1912) nähere Angaben. Weiß sagt, daß die Büschelhaare im Alter absterben, dabei verfallen und sich dicht verfilzen. Nach Burkhardt, der die Haare von *Viburnum lantana* zu den sternförmigen Büschelhaaren stellt, verlieren sie erst an alten Blättern ihren lebenden Inhalt, wobei die Basalzellen die Endzellen überleben.

Die Haare von *Viburnum lantana* bilden einen weißlichen bis manchmal bräunlichen Filz auf den jungen Blattknospen, den Blattstielen und Stämmchen, während auf den entfalteten Blättern der Mittelnerv und die stärker hervortretenden, zum Blatttrand führenden Nerven weißfilzig behaart erscheinen. Dieser Unterschied der Haarbedeckung auf der Knospe und am

alten Blatt kommt dadurch zustande, daß auf der Knospe die filzig behaarten, zum Blattrand verlaufenden Nervenpolster stark hervorspringend und dicht nebeneinander angelegt sind. Später, bei der Blattentfaltung, rücken die Haare auf den schwächeren quer verlaufenden Nerven und in den Alveolen weiter auseinander als auf den Hauptnerven, die weniger in die Fläche wachsen. Dies wurde schon von Renner 1909 beobachtet. Die obere Epidermis trägt auf den großen Blättern nur eine spärliche Behaarung.

Ich konnte an **Haartypen** Drüsenhaare und Deckhaare auffinden. Die Drüsenhaare sind keulig gestaltet, bestehen aus einem einzellreihigen Stiel von flachen breiten Zellen und einem etwas angeschwollenen mehrzelligen Ende. Wenn sie absterben, verfärben sie sich braun und fallen zusammen. Die häufigsten Vertreter der Deckhaare sind die typischen Büschelhaare, die den weißfilzigen Belag der Pflanze ausmachen. Sie bestehen aus einem kürzeren oder längeren Stiel, der im Querschnitt fünf (selten sechs) Zellen erkennen läßt. Diesem sitzt ein Büschel von vielen schlanken, geraden bis leicht gewundenen Zellen auf. Die basalen Zellen des Stieles verbreitern sich an ihrer Basis und greifen verschieden weit in die Epidermis über. Im Alter zeigen diese Haare stark verdickte Zellwände, die Büschelzellen sind luftgefüllt, während der Stiel eine bräunliche Verfärbung aufweist. — Büschelhaare finden sich am Stamm, auf Blattstielen, auf der unteren Epidermis und auf den stark hervortretenden Nerven der oberen Epidermis. Auf den schwächeren Nerven und in den Alveolen der oberen Epidermis treten sie zurück und werden von einer weiteren Deckhaarform abgelöst. Bei dieser sitzen auf einem aus fünf Zellen bestehenden Epidermishöcker vier, manchmal zwei (selten eine) Büschelzellen auf. Auch in diese Haare dringt im Alter Luft ein.

Die beginnende **Haarentwicklung** zeigt eine über das Niveau der Epidermis hervortretende Zelle an (Abb. 5 a). Mit dem weiteren Wachstum streckt und verbreitert sie sich, so daß ein gedrungenes Gebilde entsteht, das an seinem oberen abgerundeten Ende eine schwache Einbuchtung zeigt (Abb. 5 b). Dort tritt senkrecht zur Epidermis die erste Trennungswand auf (Abb. 5 c). Die beiden nebeneinander gelegenen Zellen wachsen wieder zu gedrungeenen Gebilden mit einer schwachen Einbuchtung am oberen Ende heran (Abb. 5 d). Die nun angelegte Querwand steht sowohl senkrecht zur Epidermis als auch senkrecht zur ersten Trennungswand (Abb. 5 e). Dieser Vorgang wiederholt sich etliche Male (Abb. 5 f u. g), bis schließlich alle Büschelzellen angelegt sind. Die älteren Zellen zeigen in diesem Stadium schon etwas spitzer auslaufende Enden, die jüngeren lassen noch runde Formen erkennen.

Das folgende Wachstumsstadium ist durch die Streckung der im Jugendstadium angelegten Büschelzellen sowie durch die Stielentwicklung gekennzeichnet (Abb. 5 h). Konnte man in den jugendlichen Zellen mehrere Zellsaftvakuolen erkennen, so sind diese nun zu einer einheitlichen Vakuole zusammengefloßen (Abb. 6 a). Sie wird von einem wandständigen klaren Plasmabelag umgeben, der an einer Stelle den Kern als kleinen Hügel der Wand anpreßt. Außerdem finden sich, wie auch in allen früheren Stadien, grün erscheinende tropfige Gebilde von verschiedener Größe in den Zellen. —

Die Plasmolyseform der Jugend- und Wachstumsstadien ist konvex mit einer deutlichen Kontur der Teilprotoplasten (Abb. 6 b).

Der **Absterbevorgang** beginnt zuerst in den Büschelzellen, die knapp nacheinander von den Nekroseerscheinungen erfaßt werden. Der Plasmabegab dieser Zellen erscheint gequollen und enthält leichte Niederschläge. Der Zellkern tritt deutlicher hervor, und auch in ihm sind Fällungen zu beobachten. Die grünen Gebilde bewegen sich oft in BMB hin und her. Bei der Untersuchung in KCl läßt sich zunächst eine halbstarke konturierte Plasmolyse beobachten (Abb. 6 c), die ein Übergangsstadium von der lebenden Zelle zur nekrotisch veränderten darstellt. — Mit dem Fortschreiten der Fällungserscheinungen im Plasma treten aber nur mehr äußerst schwach konturierte Teilprotoplasten auf. In ihnen finden sich zahlreiche Nieder-

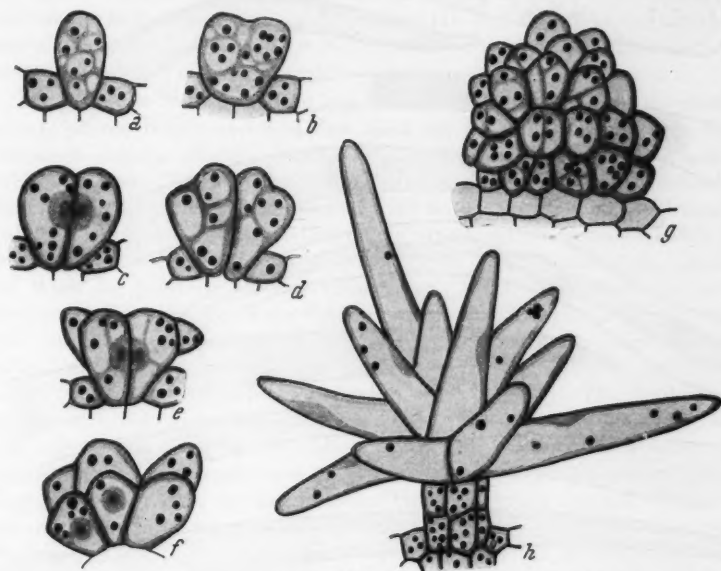


Abb. 5. *Viburnum lantana*. a—g) aufeinanderfolgende Stadien der Jugendentwicklung; h) Büschelzellen im Wachstumsstadium, beginnende Stielentwicklung.

schläge, und die grünen Gebilde lassen BMB erkennen. Der Kern ist durch die KCl-Einwirkung zu einer optisch homogenen Blase aufgequollen. Die bei *Phlomis* so deutlich zu beobachtenden kappenartigen Plasmolyseformen treten hier, bei *Viburnum lantana*, etwas in den Hintergrund. Sie lassen sich seltener beobachten und zeigen meist etwas schwächer entwickelte körnige Kappen, die eine Zellsaftvakuole mit lebhafter BMB umschließen (Abb. 6 e).

Das folgende Nekrosebild läßt bei der Untersuchung in Wasser noch stärkere Niederschläge erkennen als die vorangegangenen Stadien. Auch der Kern erscheint grobkörnig. Unter dem Einfluß von Wasser oder KCl

erfolgt ein schlaffes unregelmäßiges Zusammenziehen des Plasmasmauches (Abb. 6 f), das in KCl noch mit einem Homogenwerden des Zellkernes verbunden ist. Im optischen Querschnitt lassen sich in den randlichen Partien des Plasmasmauches die reichsten Niederschläge erkennen. In einem späteren Abschnitt dieses Stadiums tritt auch bei längerem Liegen in Wasser oder KCl keine Abhebung von der Zellwand mehr ein; der Protoplast be-

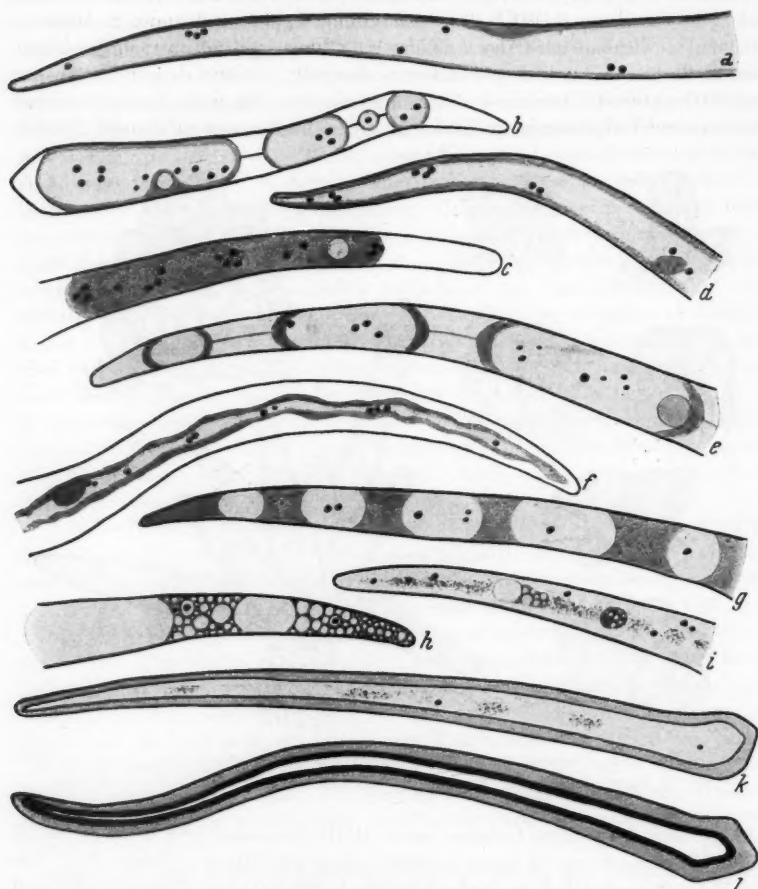


Abb. 6. *Viburnum lantana*. Nekrose, untersucht in Wasser oder 0,6 molarem KCl. a) lebende voll erwachsene Zelle in Wasser; b) desgl. in KCl: starke Kontur der Teilprotoplasten; c) beginnende Nekrose; Plasmolyse zart konturiert (KCl); d) fortgeschrittene Quellung des Plasmabelages, in Wasser; e) desgl. in KCl; f) unregelmäßige Längsabhebung des Protoplasten (in Wasser); g) Vakuole teilt und kontrahiert sich in Wasser; h) weit fortgeschrittenes Stadium: Vakuolisierung des Plasmas; i, k) Zellinhalt schwindet; l) das tote Haar von Luft erfüllt.

findet sich schon in einem weitgehend geschädigten Zustand. Dagegen ist der Tonoplast noch einer osmotischen Kontraktion fähig, wie die im weiteren Nekroseverlauf in KCl zu beobachtende Tonoplastenplasmolyse beweist. Hier hebt sich das Protoplasma nicht mehr oder nur an manchen Stellen ganz schwach von der Zellwand ab. Der Tonoplast zerfällt in mehrere kontrahierte Teiltonoplasten, in denen manchmal grüne Körner in BMB zu beobachten sind. Im Plasma, das zwischen den Vakuolen liegt, ist die Flüssigkeitsnatur auch noch durch die an manchen Stellen stattfindende BMB zu erkennen. Die Vakuolen sind gegenüber dem Plasma oft nur schwach abgezeichnet; sie erscheinen etwas heller grau. In anderen Zellen dagegen machen es kräftige Niederschläge im Plasma leicht, die Abgrenzung zwischen Vakuole und Protoplasma zu finden. Das der Tonoplastenplasmolyse gleichzusetzende Stadium bei der Untersuchung in Wasser stellt eine starke Vakuolenkontraktion dar (Abb. 6 g). Sie bietet ein ähnliches Bild wie das eben beschriebene, nur lassen sich im Kern Strukturen ausnehmen, die in KCl undeutlich werden oder ganz verschwinden.

Die weiteren Nekrorestadien ergeben, in Wasser oder KCl untersucht, jeweils gleiche Bilder und sind den schon bei *Phlomis* beschriebenen Verhältnissen überaus ähnlich. Wieder erfolgt eine Vakuolisierung des Plasmas (Abb. 6 h) derart, daß der ganze Raum zwischen den Teil-Zellsaftvakuolen dicht mit schaumigem Plasma erfüllt ist. Es finden sich größere und kleinere Vakuolen nebeneinander, zwischen denen manchmal ein grünes Gebilde zu sehen ist. Die BMB im Plasma ist erloschen, im Zellsaft dauert sie dagegen an. Auch der Kern ist deutlich vakuolisiert. Als Übergang zum nächsten Nekrorestadium, das durch ein Reißen des Plasmasclauches und Fixierung des Plasmas gekennzeichnet ist, finden sich zunächst noch einige Zellsaftvakuolen und Reste schaumigen Plasmas, das von zusammengefallenen struierten Plasmaansammlungen abgelöst wird (Abb. 6 i). Der Zellkern ist vakuolisiert. Von den grünen Körpern finden sich einige im Zellsaft in BMB. Die Zellwand ist stark verdickt. Diese Zellwandverdickung war bei manchen Zellen schon im Zustand einer frühen Nekrose eingetreten, andere Zellen zeigten dagegen noch bei beginnender Plasmafixierung geringe Wandverdickung. Die Verdickung setzt aber immer spätestens nach der Fixierung des Plasmas ein, so daß, wenn das Lumen immer leerer zu werden beginnt, die Zellen bereits stark verdickte Membranen aufweisen. Die Verbindung mit den Nachbarzellen wird durch einen im Basalteil der Zelle befindlichen Kanal aufrechterhalten. Der Zellinhalt fällt nun immer weiter der Auflösung anheim, der Zellkern zerfällt, und nur mehr wenige Plasmarestes und grüne Körner beherrschen das Zellumen (Abb. 6 k). Schließlich verschwinden aber auch diese Reste, so daß das Lumen optisch leer erscheint. Nun kann die Luftfüllung (Abb. 6 l), die auch hier wieder das endgültige Schicksal einer Büschelzelle bezeichnet, einsetzen. Meist jedoch ist es nicht eine einheitliche Luftblase, die schließlich die Zelle erfüllt, sondern es finden sich mehrere Luftblasen, getrennt durch Verwachsungen der Membranen. Letztere wachsen als Membranhöcker von beiden Seiten aufeinander zu, oder ein einzelner Vorsprung entwickelt sich so stark, daß er imstande ist, das ohnehin schmal gewordene Lumen zu durchtrennen. Küster hat 1916 bei

der Beschreibung einzelner Nekrosearten solche lokale Zelluloseabscheidungen, die sich als zentripetale Bildungen der Membran ansetzen, als degenerative Wandverdickungen bezeichnet. Er führt sie auf Wachstumshemmungen und Schädigungen der Zelle zurück.

Während des Absterbens der Büschelzellen greift die Nekrose auch auf den Stiel über. Auch hier machen sich die beschriebenen Desorganisationserscheinungen bemerkbar und lassen schließlich tote, optisch leere und schwach verdickte Zellen zurück, die meist eine leicht bräunliche Verfärbung zeigen. In besonders alten Stielen findet in den oberen Zellen eine Lumenverkleinerung statt, indem sich einerseits die Membranen verdicken, andererseits die Zellen etwas zusammenfallen. Hand in Hand damit geht eine lebhafte rotbraune Verfärbung des Stieles vor sich, die sich von oben her bis an die Stielbasis ausbreitet.

Mit der Luftfüllung in den Büschelzellen und der Braunfärbung der Stiele ist ein stabiler Zustand des Haares erreicht. So verbleibt es auf der Pflanze und fällt erst mit dem Laubabwurf im Herbst der Vernichtung anheim.

Um über den **Verlauf der Haaranlage** Aufschluß zu bekommen, habe ich die verschiedenen Stadien der Blattentwicklung während verschiedener Jahreszeiten beobachtet und die herrschenden Behaarungsverhältnisse protokolliert.

So ließen sich Anfang Februar auf einem Längsschnitt durch eine noch völlig im Holz eingeschlossene Knospe auf beiden Blattanlagen (etwa 70μ groß) noch keine Haare beobachten. Allerdings waren einige wenige und geringe Epidermisausbuchtungen zu erkennen, die eventuell als Haaranlagen gedeutet werden könnten. Führt man den Längsschnitt an einer Knospe durch, bei der das größere Blatt eben aus seiner geschützten Lage innerhalb des Holzes heraustrat, so konnte man einen etwa 160μ breiten Schutzwall beobachten, den das Blatt vor sich her-schob. Er bestand aus Haaren, die mit Zellresten verklebt waren. Oben ragten verdickte Haarzellen mit spärlichen Plasmaresten heraus, weiter im Inneren des Schutzwalles — der optisch ziemlich undurchdringlich war — fanden sich auch einige dünnwandige Haare, die zu leben schienen. Die kleineren Blattanlagen dieser Knospe zeigten keine Behaarung.

Von den beiden größeren Blättern einer jungen, wenig aus dem Holz ragenden Knospe war das eine 715μ lang und wies auf der äußeren Epidermis tote ungestielte Haare mit verdickten Membranen und Inhaltsresten auf. Daneben fanden sich verhältnismäßig dünnwandige, jedoch tote Haare vor. Die innere Epidermis trug lebende Köpfchenhaare. — Die nächstkleineren Blattanlagen (470μ) zeigten noch einige Haaransätze, während die kleinsten Blättchen (115μ) überhaupt keine Behaarung aufwiesen.

Auf einem Längsschnitt durch eine 1 mm über das Holz ragende Knospe trugen die beiden äußeren Blätter dicht gedrängt tote Büschelhaare. Die Büschelzellen waren verhältnismäßig kurz, oft verkrüppelt mit inhaltsarmen Lumina. Sie saßen auf kurzen Haarstielen auf, die ebenfalls keine Lebensreaktion mehr gaben. Die innere Blattepidermis war nur an der Mittelrippe behaart; dort saßen lebende und tote Köpfchenhaare.

Große Knospe: 13,5 mm. Die äußeren Blättchen (10 und 11 mm) lagen fest aneinander und waren nur schwer voneinander zu trennen. Im Querschnittsbild fielen die stark ausgeprägten Blattadern auf, gegen die das Alveolengewebe im Wachstum zurück war. Die Blättchen ließen an ihrer Außenseite schon makroskopisch einen

dichten kurzen bräunlichen Filz erkennen, der aus toten Haaren mit verdickten Büschelzellen bestand. Ihr schmales Restlumen enthielt manchmal einen zusammengezogenen Inhaltsschlauch oder einige wenige Inhaltsreste; in anderen Zellen erschien das Lumen leer. Die Membranen waren bräunlich verfärbt. Die Büschel wurden durch kürzere oder längere Stiele, deren Zellen meist tot oder verfärbt waren, über die Epidermis gehoben. Zwischen den Büschelzellen traten ab und zu Köpfchenhaare in allen Entwicklungsstadien auf. Die innere Epidermis war zart ausgebildet und nur an der Mittelrippe und den großen zum Blattrand ziehenden Nerven mit meist toten Köpfchenhaaren bedeckt. Erst im basalen Teil des Blattes, am Übergang der Mittelrippe in den Stiel, traten auch auf der inneren Epidermis große Büschelhaare auf. — Die äußere Epidermis der inneren Blättchen (5 mm und 3,2 mm) zeigte tote Büschelhaare, deren Membranen aber erst mittelstark verdickt waren. Auf der inneren Epidermis fanden sich entlang des Mittelnervs Jugendstadien von Köpfchenhaaren. — Zwei weitere Blattanlagen der Knospe ($465\ \mu$ und $464\ \mu$) ließen nur an der Spitze Ansätze für Köpfchenhaare erkennen. — Weitere Blattanlagen waren unbehaart.

Mitte März wurde eine 12 mm lange Knospe untersucht, die außen schon makroskopisch eine dunkle braune Haarbedeckung aufwies, die an der am Stamm anliegenden Seite heller war. Die beiden äußeren Blättchen ließen sich leicht auseinanderziehen. In bezug auf den Haarzustand hatte sich aber seit Februar nicht viel geändert. Wieder waren die Büschelzellen mit schmalen, leer erscheinenden Lumina und braun gefärbten Membranen vorherrschend. Jedoch begann in einigen schon die Luftfüllung. Auf der inneren Epidermis zeigten sich Büschelhaare nur auf der Mittelrippe. Sie waren ebenfalls tot und stark verdickt. Köpfchenhaare ließen sich auf den stärkeren Blattrippen erkennen, während sich die schwächeren Nerven und die Alveolen unbehaart zeigten. — Auch das Behaarungsverhalten der inneren Blättchen (6,5 und 2,5 mm) hatte sich seit Februar nicht viel verändert.

Mitte April dagegen konnte man auf sich öffnenden Knospen an den schwachen Blattnerven und in den Alveolen früh-nekrotische Haare und sogar Jugendstadien beobachten. Tote, verdickte Büschelzellen fanden sich auf den Blattrippen der äußeren und auf dem basalen Teil der Mittelrippe der inneren Epidermis vor. — Auf einem entfalteten Blatt zeigten sich zu dieser Jahreszeit an den stark ausgebildeten Blattnerven der unteren Epidermis tote Büschelhaare, die Stiele aufwiesen und verdickte inhaltsleere Büschelzellen mit oft gelblichbraun verfärbten Zellwänden. In manche Büschelzellen war schon Luft eingedrungen. Zwischen den toten Haaren traten (besonders in der Mitte gegen die Blattspitze zu) jüngere Stadien auf, die lebten oder frühe Nekrosen beobachten ließen. Solche Haare fanden sich auch auf den schwächeren Blattrippen. Die obere Epidermis trug auf den starken Blattnerven teils tote Büschelhaare, die aber nicht so weit ausgestaltet waren wie auf den unteren Epidermen. Vorwiegend fanden sich lebende und nekrotische Stadien. In den Alveolen und auf den schwachen Blattnerven traten meist lebende, manchmal auch nekrotische vier- bis zwei- (bzw. ein-) armige Haare auf. Jugendstadien der Deckhaare ließen sich am ganzen Blatt nicht beobachten.

Ende August wurde ein Stämmchen untersucht, das aus vier großen entfaltenen Blättern bestand und außerdem eine fest geschlossene Blattknospe aufwies. Auf den entfaltenen Blättern traten auf der ganzen unteren Epidermis nur tote Büschelhaare mit kürzeren oder längeren Stielen auf. Die Büschelzellen waren luftgefüllt oder in Füllung begriffen; manche erschienen optisch leer. Die Haarstiele waren gelblich bis bräunlich verfärbt. Auf den schwachen Blattnerven zeigten sich manchmal auch noch vierarmige Haare, von denen die meisten ein optisch leer erscheinendes Lumen aufwiesen, einige am weitesten in der Entwicklung fortgeschrittene aber

beginnende Luftfüllung beobachten ließen. Auf der oberen Epidermis zeigten die Haare das gleiche Verhalten. Köpfchenhaare waren im lebenden und toten Zustand zu beobachten; lebende Deckhaare traten jedoch nicht auf. — Die geschlossene Blattknospe bestand aus mehreren kleinen Blättchen. Blatt 17 mm: Die beiden von einem weißen Haarfilz umhüllten Blättchen waren schwer zu trennen. Der Haarbesatz, der direkt mit der Außenwelt in Berührung kam, bestand vorwiegend aus toten, luftgefüllten Büschelhaaren. Dazwischen traten aber auch lebende Büschelhaare auf sowie alle Übergänge bis zu ausgestalteten Haaren. An den geschützten Blatteilen zeigten sich häufiger lebende Stadien und frühe Nekrosen, die luftgefüllten Büschelzellen traten nur selten auf. Jugend- und Wachstumsstadien waren vorhanden. Auf der inneren Epidermis war eine Behaarung nur an der Mittelrippe zu beobachten. Auch hier traten alle Übergänge von den vorherrschenden lebenden Haaren bis zu den inhaltsleeren, selten luftgefüllten Büscheln auf. Köpfchenhaare zeigten sich auf beiden Epidermen. Blättchen 6,5 mm: Die äußere Epidermis ließ alle Übergänge von Jugendstadien bis zu den luftgefüllten verdickten Zellen erkennen. Am Mittelnerv überwogen die letzteren. Auf der inneren Epidermis war nur die Mittelrippe behaart; hier fanden sich einige Köpfchenhaare. Blättchen 4,5 mm: Von der Blattspitze bis zur Mitte des Blattes war die äußere Epidermis dicht behaart. Frühe Nekrosen überwogen hier, aber auch lebende Haare, stark verdickte Zellen, sogar solche mit beginnender Luftfüllung konnten beobachtet werden. Von der Mitte gegen die Basis des Blattes traten nur mehr lebende Deckhaare in Form von Wachstums- und Jugendstadien sowie Köpfchenhaare auf. Die innere Epidermis war unbehaart. Blättchen 1,7 mm: Die Behaarungsintensität wurde von der Blattspitze gegen die Basis zu schwächer. Es traten lebende Haare und solche mit frühen Nekrosen auf, Jugendstadien waren häufig. Einige in der Entwicklung weiter fortgeschrittene Haare zeigten schmale Lumina mit einigen Zellresten. Die innere Epidermis ist unbehaart. Blättchen 449 μ : An der Spitze traten noch einige Epidermisausstülpungen auf.

Weitere Blattanlagen ließen keine Behaarung erkennen.

Ergebnis der Blattuntersuchungen: Schon Anfang Februar zeigten kleine, noch vom Holz umschlossene Blattanlagen an ihren Spitzen kleine Epidermishöcker, die als Haaranlagen gedeutet werden können. Beim Durchtritt der Blattanlage durch das Holz nach außen sind die Haare der vordringenden Blattspitze schon entwickelt und verdickt. Sie haben den Schutz des jungen Organs zu übernehmen. Außerdem sind diese Haare stark mit Zellresten (wahrscheinlich Rindenteilen) verklebt, unter deren Schutz die noch jüngeren dünnwandigeren Haare ihre Ausgestaltung durchmachen. Die Haare werden so dicht angelegt, daß sie auch beim weiteren Wachstum der Blattknospe diese schützend umgeben. Die dichte Haarbekleidung ist für die Knospe von großer Bedeutung, da sie keine Hüllblätter besitzt. Die Haare sind stark verdickt, das Lumen oft von degenerativen Membranverdickungen überbrückt. Die Zellwände sind bräunlich verfärbt. Diese Verfärbung tritt aber nur an Haaren auf, die direkt mit der Außenwelt in Berührung kommen. Dort, wo die beiden gleichaltrigen Blättchen aneinanderstoßen, oder an Stielen, an denen sich die Blättchen einem Stammteil anlegen und von diesem geschützt werden, ist die Verfärbung nicht zu beobachten. Sie tritt auch später, wenn günstigere klimatische Bedingungen herrschen, nicht mehr neu auf. — Die Haare besitzen vorerst noch keine Stiele; diese werden erst nach und nach gebildet.

In diesem Zustand überdauern die noch kleinen Knospen die kalte Jahreszeit. Die beiden gleich großen Blättchen sind dabei fest aneinandergepreßt und nur schwer voneinander zu trennen. Im Querschnitt durch die Knospe ist zu erkennen, daß die Blattadern sehr deutlich ausgeprägt sind und den größten Teil der äußeren Oberfläche darstellen, während die zwischen ihnen liegenden Blatteile im Wachstum außerordentlich zurück sind. Vor der Öffnung der Knospe sind alle Büschelhaare tot und mit mehr oder minder langen Stielen versehen, die manchmal noch in den untersten Zellen Lebensreaktion geben. Die zarte innere Blattepidermis ist bis auf die Mittelrippe unbehaart. Dort finden sich einige Köpfchenhaare, während der basale Teil der Mittelrippe mit Büschelhaaren besetzt ist.

In der Weiterentwicklung der Blattknospe mit dem Eintreten des Frühlings lassen sich die beiden gleichaltrigen Blättchen leicht voneinander trennen; in bezug auf die Haarentwicklung ist aber noch keine Veränderung eingetreten. Erst beim Auseinanderweichen und bei der Entfaltung der Blättchen beginnt die Neuanlage von Jugendstadien. Diese dauert indes nicht lange, sondern wird nach Entfaltung des Blattes wieder eingestellt. Jetzt findet an den Haaren nur mehr die Ausgestaltung zum endgültigen Zustand statt. Die Haare rücken dabei mit dem Wachstum des Blattes auseinander, so daß auf den großen Blättern nur die stärksten schon frühzeitig angelegten Blattnerven weißfilzig behaart erscheinen. — War für die Haarbedeckung während der kalten Jahreszeit das Fehlen jeglicher Übergänge in bezug auf den Entwicklungszustand der Haare charakteristisch, so ist dies in der wärmeren Jahreszeit nicht zu beobachten. Auf den kleinsten Blattanlagen bis zu den sich entfaltenden Blättchen werden nun dauernd neue Haare angelegt, so daß hier ganze Entwicklungsreihen nebeneinander vorkommen. Die Haare treten auf den jüngsten Blättchen zuerst an der Spitze auf und setzen sich dann über die äußere Epidermis gegen die Basis hin fort. Erst wenn auf der äußeren Epidermis schon einige luft-erfüllte Zellen zu beobachten sind, beginnt die Haarentwicklung auch auf der inneren, viel zarter entwickelten Epidermis. Hier sind es zuerst die Köpfchenhaare, die auf der Mittelrippe und den starken Blattnerven auftreten, dann folgen, vom Blattstiel auf den Mittelnerv übergreifend, die ersten Büschelhaare. Diese breiten sich auf den stärkeren Nerven aus, während auf den schwächeren Nerven und in den Alveolen vier- bis zweiästige Haare vorherrschen.

Mit der Entfaltung der Blättchen wird sowohl auf der inneren als auch auf der äußeren Epidermis die Neuanlage von Büschelhaaren spärlicher. Mit der vollendeten Blattentfaltung wird sie überhaupt eingestellt. Auf völlig entfalteten Blättern treten nur mehr tote Haare auf.

Alles spricht dafür, daß die Dauer des Lebensablaufes in den Büschelhaaren äußerst kurz ist, während die endgültige Ausgestaltung längere Zeit in Anspruch nimmt. In der wärmeren Jahreszeit finden sich die ersten Haaranlagen auf Blättchen von ca. $450\ \mu$. Auf den nächst größeren Blättchen von 1,7 mm derselben Knospe zeigten sich schon Haare mit verdickten Membranen und wenig Inhaltsresten. Die am weitesten in der Entwicklung fortgeschrittenen Haare eines Blättchens von 4,5 mm wiesen beginnende

Luftfüllung auf; auf einem 6,5 mm langen Blatt waren einige Büschel schon weitgehend luftgefüllt. Bis ins äußerste Zellende luftgefüllte Büschelhaare fanden sich aber nur auf großen entfalteten Blättern.

Zusammenfassung

Phlomis fruticosa und *Viburnum lantana* haben auf den jungen Blättern einen dichten filzigen Haarüberzug von frühabsterbenden Haaren. Im Alter sind die Blätter von *Phlomis fruticosa* weiterhin dicht behaart. Dagegen erscheinen auf den alten Blättern von *Viburnum lantana*, die ein starkes Flächenwachstum durchgemacht haben, nur mehr die Hauptnervenstränge der unteren Epidermis dicht behaart, auf den schwächeren Nerven, in den Alveolen und auf der oberen Epidermis sind die Haare weiter auseinandergerückt.

Es tritt ein vorherrschender Deckhaartypus auf, der aber mehr oder weniger Übergänge zu den bei der betreffenden Familie noch auftretenden einfacheren Haarformen zeigt. Das Wachstum der Haare war bei den beiden Versuchspflanzen basipetal, d. h. die erstgebildete ältere Querwand bleibt die der Haarspitze nächstgelegene und die späteren Zellen werden sukzessiv von der Basalzelle geliefert. Die jeweils jüngste Querwand bildet daher die Decke der Basalzelle.

Die Haaranlage wurde an Hand von Blattuntersuchungen studiert. Dabei zeigte es sich, daß bei *Viburnum lantana* bereits die kleinen Blattanlagen, die schon in den Wintermonaten aus dem Holz hervorbrechen, durch einen Filz toter, mit Rindenteilen verklebter Haare geschützt sind. Während der kalten Jahreszeit findet hier keine Neuanlage von Haaren statt, so daß die sonst auf jungen Blättern so reichlichen Übergänge von Jugendstadien zu toten Haaren fehlen. Erst mit dem Einsetzen der Blattentfaltung erfolgt die Anlage von neuen Jugendstadien.

Jene Blättchen von *Viburnum lantana*, die in der warmen Jahreszeit angelegt werden, verhalten sich aber in bezug auf die Haaranlage wie *Phlomis fruticosa*, die ja im Glashaus keinen extremen Temperaturen ausgesetzt ist. Hier erfolgt die erste Haaranlage an der Blattspitze junger Blättchen von 0,3 bis 0,5 mm Mittellängere. Die Haarentwicklung setzt sich dann auf der äußeren Epidermis gegen die Basis hin fort. Auf der inneren Epidermis beginnt die erste Haaranlage etwas später, daher sind die am weitesten entwickelten Haare der äußeren Epidermis jenen der inneren in der Entwicklung voraus.

Die Haaranlage erfolgt schubweise, indem zwischen den bereits gebildeten Haaren immer neue Anlagen auftreten. Dadurch lassen sich auf den Knospenblättern alle Übergänge von Jugendstadien bis zu toten Haaren nebeneinander beobachten. Für das Blatt wird dadurch trotz fortschreitendem Flächenwachstum eine dichte Haarbedeckung gewährleistet. Mit der Entfaltung der Knospe wird die Neuanlage von Haaren eingestellt; es erfolgt nur mehr eine Weiterentwicklung und Ausgestaltung der bereits angelegten Haare. Das Spärlicherwerden der Haarbedeckung auf alten *Viburnum*-Blättern ist auf das Auseinanderrücken der Haare bei fortschreitendem Flächenwachstum der Blätter zurückzuführen.

Die Haare sind durchwegs kurzlebig. Die am weitesten in der Entwicklung fortgeschrittenen Haare (= jene, die am frühesten angelegt wurden) zeigen schon auf kleinen in der Knospe befindlichen Blättern Nekrotestadien. Beim Öffnen der Knospe wird in diesen Haaren die endgültige Ausgestaltung schon angebahnt. Die Entwicklung der Haare und die Absterbeerscheinungen in den Zellen gehen rasch vor sich, während die endgültige Ausgestaltung der Zelle längere Zeit in Anspruch nimmt.

Die physiologisch bedingte Nekrose beginnt in der erstgebildeten Zelle, setzt sich dann über die nächstgebildeten hin fort und endet in der basalen und jüngsten Haarzelle. Damit kommt dem Haarstiel eine anscheinend längere Lebensdauer zu als den Endzellen. Der Absterbevorgang ist durch charakteristische Plasmabilder gekennzeichnet, die gleitende Übergänge zeigen. Besonders deutlich treten die Nekrorestadien bei einer vergleichenden Untersuchung in Wasser und in einer hypertonen Lösung hervor.

Das lebende konvexe Plasmolyse zeigende Plasma geht am Beginn der Desorganisation in einen Zustand über, der bei der Untersuchung in Wasser mehr oder weniger deutlich eine Quellung des Plasmabelages erkennen läßt. Diesem Stadium entspricht eine schwach konturierte Plasmolyse. Mit dem Fortschreiten der Quellung und dem Ausfallen von Niederschlägen im Plasma (Degenerationsgranula) kann im Plasmolytikum nur mehr eine der Kappenplasmolyse vergleichbare Form der osmotischen Kontraktion gefunden werden. Im weiteren Verlauf der Nekrose tritt in beiden Medien nur mehr eine unregelmäßige Längsabhebung des Protoplasten ein. Untersucht man Zellen mit noch fortgeschrittenerer Nekrose, so zeigt das Plasma keine Reaktion mehr, während sich die Vakuole bei der Untersuchung in Wasser kontrahiert (Vakuolenkontraktion). Im Plasmolytikum kommt es zu einem Tonoplastenstadium. Das Protoplasma ist in diesem Stadium noch flüssig, wie die oft zu beobachtende BMB erkennen läßt.

Der weitere Verlauf des Nekrosevorganges zeigt in beiden Untersuchungsflüssigkeiten gleiche Bilder. Er wird eingeleitet durch die Vakuolisierung des Protoplasmas. Darauf folgt der endgültige Zelltod: Reißen des Plasmanschlauches und Fixierung des Plasmas. Das fixierte Plasma bildet zunächst noch ein mehr oder weniger zusammenhängendes Gerüst und fällt dann zu kleinen körnigen Resten zusammen. Es ist allseitig von ausgeflossenem Zellsaft umgeben, in dem noch BMB stattfinden kann. Der sichtbare Zellinhalt wird danach immer geringer und auch die BMB im Zellsaft erlischt. Die endgültige Ausgestaltung der Zelle wird vorbereitet.

Diese letzte Ausgestaltung tritt bei *Phlomis fruticosa* durch Luftfüllung ein. Bei *Viburnum lantana* verdicken sich die Membranen und in den schmalen Lumenrest tritt Luft. Dadurch ist ein stationärer Zustand erreicht, in dem die Haare auf der Pflanze verbleiben, bis das Blatt der Zerstörung anheimfällt.

Literatur

- Bary, H. A. de, 1877: Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne, Leipzig.
- Baumert, K., 1907: Experimentelle Untersuchungen über Lichtschutzeinrichtung an grünen Blättern. Beitr. Biol. Pfl. 9, 84—116.
- Burkhardt, W., 1912: Die Lebensdauer der Pflanzenhaare. Borno Diss. Leipzig.
- Candolle, de, 1833: Organographie végétale. Paris 1827, übersetzt von Johannes Röper, Stuttgart und Tübingen, Cotta'sche Buchhandlung.
- Guettard, 1749: Sur les corps glanduleux des plants, leur filet ou poils, et les matières qui en sortent. Mémoires de l'académie royale des sciences, année 1745, Paris. S. 261—303.

- Guettard, 1747: *Séconde Mémoires sur les glandes des plantes et le premier sur l'usage, que l'on peut faire de ces parties dans l'établissement des genres des plantes. Mém. de l'acad. des sciences, anné 1747, S. 515—560.*
- Haberlandt, G., 1924: *Physiologische Pflanzenanatomie. 6. Auflage. Leipzig.*
- Hirsch, W., 1899: *Untersuchungen über die Entwicklung der Haare bei den Pflanzen. Diss. Berlin.*
- Keller, R., 1891: *Über Erscheinungen des normalen Haarverlustes an Vegetationsorganen der Gefäßpflanzen. Nova acta 55, 307. Halle, Diss. Berlin.*
- Küster, E., 1916: *Pathologische Pflanzenanatomie. 2. Aufl. Jena.*
- Renner, O., 1909: *Zur Morphologie und Ökologie der pflanzlichen Behaarung. Flora 99, 127.*
- Schrank, F. P., 1794: *Von den Nebengefäßen der Pflanzen und ihrem Nutzen. 5 Abhandlungen. 1789—1792. Halle.*
- Seybold, A., 1931: *Weitere Beiträge zur Transpirationsanalyse. Planta 14, 589.*
- Solereeder, H., 1908: *Systematische Anatomie der Dicotyledonen. Stuttgart.*
- Weiß, A., 1867: *Die Pflanzenhaare. Berlin.*
- Wiesner, J., 1867: *Die natürlichen Einrichtungen zum Schutze des Chlorophylls der lebenden Pflanzen. Wien.*

Stomata fehlen den Blattflecken von *Maranta leuconeura*

Von

Brigitte Schittengruber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 28. Februar 1953)

Die Laubblätter von *Maranta leuconeura* haben auf der Lamina in symmetrischer Anordnung zum Mittelnerv Flecken, die sich durch ihre Färbung von der übrigen Fläche unterscheiden (Abb. 1). Die Flecken sind in der Jugend des Blattes dunkel rötlichbraun, später werden sie sattgrün, die übrige Lamina dagegen ist und bleibt blaß graugrün. Meist sind vier Flecken von verschiedener Ausdehnung auf der Oberseite jeder Blatthälfte vorhanden.

Die Anatomie der bunten *Marantaceen*-Blätter ist schon untersucht worden, die Literatur darüber haben Solereder und Meyer (1930) zusammengestellt, man vergleiche darüber ferner speziell: Schlesinger (1895), Möbius (1918) und Loesener (1930).

Über das Vorkommen der Stomata auf den *Marantaceen*-Blättern liegen bereits Angaben vor: Spaltöffnungen sind an der Blattunterseite reichlich, an der Oberseite spärlich. Darüber, ob auch die Flecken der Blattoberseite Stomata besitzen, fanden wir nur die kurze Bemerkung, daß die Flecken von *Calathea Massangeana* stomatafrei sind (Möbius 1918). Möbius dürfte darunter die Varietät von *Maranta leuconeura* var. *Massangeana* verstanden haben, die sich von der typischen *Maranta leuconeura* durch kleinere Blätter und purpurrote Färbung der Blattunterseite unterscheidet.

Durch die Untersuchungen von Bünning und Sagromsky (1948) ist die Aufmerksamkeit erneut auf das Problem der Spaltöffnungsverteilung gelenkt worden. Es schien uns daher von Interesse, die Verteilung der



Abb. 1. Junges Blatt von *Maranta leuconeura* mit dunkelroten Flecken.

Stomata auf den bunten Blättern von *Maranta leuconeura* genauer zu untersuchen.

Die Pflanzen stammen aus den Gewächshäusern des Institutes für systematische Botanik der Universität Graz. Herr Prof. Dr. F. Widder hat sie zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Hiefür sei bestens gedankt.

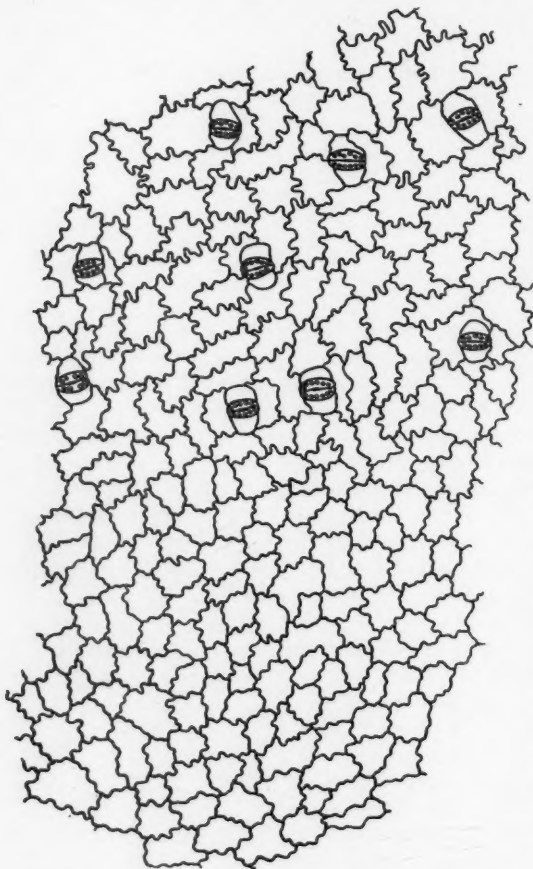


Abb. 2. Epidermis der Oberseite von *Maranta leuconeura*. Grenze zwischen der stomatafreien Zone des roten Fleckes und der stomataführenden graugrünen Zone.

Zunächst konnte die Angabe von Möbius (1918), daß die Epidermis der rotbraunen, später sattgrünen Flecke spaltöffnungs-frei sind, auch für die Blätter von *Maranta leuconeura* vollkommen bestätigt werden (Abb. 2). Dies ist um so auffallender, als die Zahl der Stomata an den angrenzenden graugrünen Blattarealen nicht gering ist, sie beträgt durchschnittlich 29 pro Quadratmillimeter. Abgesehen von dem Mangel an Spaltöffnungen unterscheidet sich die Epidermis der roten Stellen von der graugrünen durch folgende Merkmale:

Die „rote Epidermis“ ist in ihrer Jugend ausgezeichnet durch den Besitz von Anthozyan. Wenn die Blätter älter werden, so verschwindet die Rotfärbung. Es liegt

hier ein typischer Fall vor für das Erlöschen der anthozyanbedingten Rotfärbung mit fortschreitender Entwicklung. Paech und Eberhardt (1952) haben diesen Vorgang, der sich an den Blättern verschiedener Pflanzen einstellt, bei *Vitis vinifera*, *Viburnum tomentosum*, *Hedera*

helix u. a. studiert. Die genannten Autoren sind der Ansicht, daß dieser Farbwechsel durch einen enzymatischen Umbau des Anthozyans hervorgerufen wird. Ich habe untersucht, ob die Epidermiszellen, die das Anthozyan „verloren“ haben, etwa Anthoxanthin enthalten. Auf Zusatz von Ammoniakwasser oder verdünnter KOH tritt Gelbfärbung ein. Anthoxanthin ist also in diesen Epidermiszellen vorhanden.

Morphologisch unterscheidet sich die „Flecken-Epidermis“ von der Epidermis der grünen Teile dadurch, daß die Außenwände der Zellen der ersteren papillös sind, die der letzteren nicht. Die eventuelle Bedeutung dieses Unterschiedes für die Verteilung der Stomata wird später zu erörtern sein.

Was die subepidermale Zellschicht betrifft, so geben Blattquerschnitte Aufschluß darüber. Sie lassen erkennen, daß die chloroplastenfreie Subepidermis unterhalb der „roten“ und der „farblosen“ Epidermis sich nicht unterscheidet. Auch das Chlorenchym unterhalb der roten Flecke weist keine Unterschiede auf gegenüber dem der anderen Blatteile. Es fragt sich daher, warum die Blattflecken, nachdem sie mit zunehmendem Alter des Blattes den roten Farbstoff eingebüßt haben, ein viel dunkleres Grün zeigen als die angrenzenden Zonen. Vielleicht ist dies durch optische Verhältnisse bedingt, die durch die Papillen der Epidermis gegeben sind.

Die Epidermiszellen der roten Flecke unterscheiden sich nicht nur morphologisch von denen der grünen Teile, sondern auch zellphysiologisch. Es wurde zuerst der osmotische Wert bei Grenzplasmolyse bestimmt. Die Feststellung der Grenzplasmolyse ist nicht ganz leicht, weil der protoplasmatische Wandbelag äußerst zart und daher schwer sichtbar ist. Vitalfärbung der Zellen mit Neutralrot erleichtert das Erkennen der Grenzplasmolyse. Die Vitalfärbung des Zellsaftes gelingt bei $p_H = 6,1$. Als Plasmolytikum wurde Glukose verwendet. Es ergab sich, daß der osmotische Wert bei Grenzplasmolyse in den Epidermiszellen der roten Flecke stets etwas geringer war als der in den Oberhautzellen der übrigen Blattstellen. Der Unterschied ist nicht groß, aber konstant, er beträgt 0,04 mol. Glukose.

Weiterhin wurde versucht, mittels der Deplasmolyse-Zeitmethode die Permeabilität der Epidermiszellen für Harnstoff zu ermitteln oder doch wenigstens zu schätzen.

Plasmolysiert wurde mit Harnstoff in einer Konzentration von 0,5 mol. In den roten Epidermiszellen ist die Plasmolyse in dieser Harnstofflösung nach etwa 60 Minuten zurückgegangen, in den übrigen Epidermiszellen betrug die Deplasmolysezeit nur 40 Minuten. Quantitative Unterschiede für die Harnstoffpermeabilität lassen sich an den *Maranta*-Epidermiszellen wegen ihrer unregelmäßigen Formen nicht ermitteln. Das eine scheint jedoch gewiß: Die Harnstoffpermeabilität der roten Epidermiszellen ist geringer als die der anderen. Es ist allerdings zu bedenken, daß ja die roten Epidermiszellen in der Harnstofflösung infolge ihres geringeren osmotischen Wertes einen höheren Plasmolysegrad erreichen und daher auch die Deplasmolyse längere Zeit in Anspruch nimmt.

Im allgemeinen grenzen die roten Blattareale unvermittelt an die farblosen. Es fanden sich aber junge Blätter, bei denen die dunkelroten Flecke von einem schwächer rot gefärbten Saum umgeben waren. Es war von be-

sonderem Interesse, ob die Epidermis auch dieser lichtroten Stellen frei von Spaltöffnungen ist oder ob sich hier etwa eine geringere Zahl von Stomata findet als an den farblosen Stellen, die lichtroten Partien also gewissermaßen hinsichtlich des Vorkommens an Spaltöffnungen eine Übergangszone darstellen. Die Epidermiszellen der lichtroten Säume gleichen der Form nach ganz denen der farblosen Gebiete, sie enthalten jedoch Anthozyan, wenn auch in schwächerer Konzentration. Es zeigte sich nun, daß in den Übergangsarealen Stomata vorhanden sind. Während die dunkelrote Epidermis überhaupt keine Stomata aufweist, die ungefärbte aber — wie erwähnt — 29 pro Quadratmillimeter, finden sich auf der lichtroten Saumzone im Durchschnitt 19 Spaltöffnungen je Quadratmillimeter. Hinsichtlich der Stomatazahl nimmt also der „Saum“ tatsächlich eine Mittelstellung zwischen der stomatafreien roten und der stomatareichen weißen Zone ein.

An den lichtroten Übergangszonen fällt auf, daß zwar die gewöhnlichen Epidermiszellen anthozyangefärbt sind, die Schließ- und Nebenzellen aber nicht. Das Fehlen von Anthozyan in den Schließzellen ist ja allerdings die Regel. Seltener kommt es im allgemeinen vor, daß, wie es hier der Fall ist, um die Zellen des Spaltöffnungsapparates noch ein Kranz von anthozyanfreien Zellen liegt, die ihrer Gestalt nach zu den gewöhnlichen Oberhautzellen zu rechnen wären.

Schließlich sei die Frage erörtert, ob sich aus den dargelegten Beobachtungen Anhaltspunkte dafür ergeben, warum an den dunkelroten Blattflecken die Stomata fehlen. Man wäre zunächst geneigt, einen Zusammenhang zwischen dem Anthozyangehalt und dem Fehlen der Spaltöffnungen zu vermuten, wobei beide Merkmale von gemeinsamen, noch unbekannten Faktoren abhängen könnten. Zugunsten dieser Annahme ließe sich anführen, daß der blaßrote anthozyanärmere Saum Spaltöffnungen aufweist, wenn auch in geringerer Zahl. Wie die Untersuchungen über den osmotischen Wert und die Harnstoffpermeabilität ergeben haben, unterscheidet sich die Epidermis der roten und der graugrünen Blatteile allerdings nicht nur durch das Vorkommen und Fehlen des Anthozyans. Am meisten Wahrscheinlichkeit dürfte die Annahme haben, daß zwischen dem Fehlen der Stomata an den roten Flecken und der papillösen Ausbildung der dortigen Epidermiszellen eine Relation besteht. Die Papillen sind ja als Trichome aufzufassen und die stomatafeindlichen Eigenschaften der Haare sind durch die Untersuchungen von Bünning (1948) bekannt. In diesem Zusammenhang ist es beachtenswert, daß die Epidermiszellen des blaßroten Saumes nicht papillös sind. Stomata-Hemmstoffe, die von der papillösen Zone ausgehen, könnten die Stomatazahl der blaßroten Zone verringern.

Zusammenfassung

An den in der Jugend dunkel rotbraunen Blattflecken der Lamina des Laubblattes von *Maranta leuconeura* sind keine Stomata vorhanden, an den graugrünen Blatteilen relativ viele. Das Fehlen der Spaltöffnungen wird mit dem papillösen Charakter der Epidermiszellen dieser Blattstellen in Zusammenhang gebracht. Die Oberhautzellen der roten Flecke haben einen

etwas geringeren osmotischen Wert und eine niedrigere Permeabilität für Harnstoff als die der graugrünen Blattpartien. An manchen jungen Blättern umgibt die dunkelroten Flecke ein lichtroter Saum. Die Epidermis dieses Saumes weist Stomata auf, allerdings in wesentlich geringerer Zahl als die Oberhaut der graugrünen Blattpartien.

Literatur

- Bünning und Sagromsky, 1948: Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. *Zeitschr. Naturforsch.* 3 b.
- Loesener, 1930: Marantaceen. In Engler & Prantl, *Natürl. Pflanzenfam.*, 2. Aufl., 15 a.
- Möbius, 1918: Merkwürdige Zeichnungen auf Marantaceen-Blättern. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 36.
- Paech und Eberhardt, 1952: Untersuchungen zur Biosynthese der Anthocyane. *Zeitschr. Naturforsch.* 7 b.
- Solereider und Meyer, 1930: Systematische Anatomie der Monokotyledonen. IV. Berlin.
- Schlesinger, 1895: Vergleichende Anatomie des Blattes von Marantaceen. Diss. Erlangen.
- Schwendener, 1896: Das Wassergewebe im Gelenkpolster der Marantaceen. Neudruck 1898: Schwendener: *Gesammelte Botan. Mitteil.* II. Berlin.

Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit¹

Von

Siegfried Strugger

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Mit 25 Textabbildungen und 1 Tafel

(Eingelangt am 10. Juli 1953)

„Die Chromatophoren, deren Gesamtheit in jeder Pflanze als das Chromatophorensystem zusammengefaßt werden soll, führen ein sehr unabhängiges Leben; sie verhalten sich eher wie selbständige Organismen als wie die Glieder eines Organismus.“

A. F. W. Schimper (1885).

Seit den klassischen Untersuchungen von Schimper (1883, 1885) und von A. Meyer (1882, 1883) werden die Plastiden als Zellorganelle sui generis aufgefaßt. Nach dieser Konzeption sind die Plastiden befähigt, sich nur durch Teilung zu vermehren. Sie können entgegen den Ansichten der Autoren vor Schimper und Meyer (H. v. Mohl 1855, Boehm 1856, Haberlandt 1877, Mikosch 1879) niemals de novo in der Zelle entstehen und bilden ein Kontinuum von Zellgeneration zu Zellgeneration.

Diese Kontinuitätslehre ist nicht unwidersprochen geblieben. Schon Mikosch (1885) und Belzung (1887, 1891) veröffentlichten Arbeiten, welche aber heute nur mehr historisches Interesse beanspruchen dürfen, nach denen Plastiden aus dem Protoplasma in Verbindung mit Stärkekörnern neu entstehen könnten. Andere Autoren, wie Schiller (1909) und Stauffacher (1910), stellten sogar die Behauptung auf, nach welcher sich die Plastiden aus dem Zellkern entwickeln sollten. Auch diese Auffassung beruht auf einem Irrtum, da die systrophische Kernlage der Proplastiden in embryonalen Zellen wohl diese Autoren zu einer solchen voriligen Deutung veranlaßt haben dürfte.

Viel ernster ist im Zuge der historischen Betrachtung des Problems der Herkunft der Plastiden eine Richtung zu beurteilen, welche ihren Ausgangspunkt in der Arbeit von Meves (1904) genommen hat.

¹ Otto Renner zum 70. Geburtstag.

Mit Hilfe besonderer Fixationsmethoden („Méthodes mitochondriales“ der späteren französischen Autoren) konnte Meves (1904) in Meristemzellen von Pflanzen die Existenz von Chondriosomen nachweisen, welche schon vorher als gleichartige Gebilde an tierischen Zellen bekannt geworden waren. Diese Identifikation führt der genannte Autor auf Grund der ähnlichen Fixierungsresistenz und Färbungseigenschaften sowie auf morphologischer Grundlage durch. Damit begann eine intensive Bearbeitung des Chondriosomenproblems an Pflanzenzellen, welche in zahlreichen Arbeiten bis zur Gegenwart anhält. Lewitzky (1910, 1911 a, 1911 b) ist der erste Forscher, welcher nach dem Erscheinen der Arbeiten von Meves sich erneut der Untersuchung pflanzlicher Chondriosomen zuwandte. Er konnte in den embryonalen Blattzellen von *Helodeablättchen* nur Gebilde im Cytoplasma auffinden, welche in der Form, Größe und in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Fixierungsmitteln sich wie die tierischen Chondriosomen verhalten. Parallel zu den Fixationsuntersuchungen stellte er Vitalbeobachtungen an und konnte dieselben Gebilde *intra vitam* feststellen. Im Zusammenhang mit dem Problem der Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten kommt er zur entscheidenden Annahme, daß sich die Chloroplasten der erwachsenen *Helodeazellen* aus den Chondriosomen der embryonalen Zellen entwickeln. Meves schloß sich 1916 und 1917 dieser Meinung an. Ebenso äußerten sich Pensa (1910), Forenbacher (1911) und Alvarado (1923).

Durch Guilliermond (1911—1933) und seine Mitarbeiter ist die Chondriosomentheorie der Plastidenentstehung im größten Umfange bearbeitet worden (s. Literaturverzeichnis). Er begründete die französische Schule der Chondriosomenforschung, deren Beobachtungen und Theorien im „*Traité de Cytologie végétale*“ von Guilliermond, Mangenot und Plantefol (1933) ausführlich niedergelegt wurden. Die Bemühungen der französischen Schule stellen den größten Versuch dar, die von Schimper und Meyer ausgesprochene Individualitäts- und Kontinuitätstheorie der Plastiden zu widerlegen und die Chondriosomentheorie zu beweisen. Rudolph (1912), Sapêhin (1913, 1915) und Noack (1921) vermochten sich der Chondriosomentheorie der Entstehung der Plastiden nicht anzuschließen und erbrachten erneut Beobachtungstatsachen, welche mehr für die Richtigkeit der Schimperschen Auffassung sprachen.

Bei dieser Sachlage erscheint es zweckmäßig, zunächst die klassische Auffassung von Schimper und Meyer kurz zu formulieren und die wichtigsten Tatsachen anzuführen, welche dafür sprechen. In diesem Zusammenhang soll die Formulierung der Anhänger der Chondriosomenlehre an den entscheidenden Stellen erörtert werden.

Nach Schimper und Meyer sind die Plastiden in den embryonalen Zellen in stark reduzierter Form enthalten. Sie stellen aber auch dann noch ein besonderes Organellsystem dar, welches nicht mit den Chondriosomen (vgl. A. Meyer 1911, 1916, 1920, 1926) zu identifizieren ist. Daher empfiehlt es sich, im Sinne der klassischen Kontinuitätslehre die embryonale Phase der Plastiden (Randolph 1922 und Bowen 1928, 1929) als Proplastiden zu bezeichnen. Mit zunehmender Entwicklung und Differenzierung der

jugendlichen Zellen erfahren die Proplastiden eine Metamorphose zu fertigen, also funktionstüchtigen Plastiden. Sie werden entweder Leukoplasten, Chloroplasten oder Chromoplasten. Auch kompliziertere Metamorphosenfolgen sind bereits beschrieben worden (Literatur bei Küster 1935) und zeugen dafür, wie sehr der Begriff „Metamorphose“ Schimpers sowohl im normalen als auch im pathologischen Entwicklungsgeschehen zu Recht besteht.

Das Chondriom ist nach dieser Auffassung niemals mit dem Plastidom identisch. Es ist vielmehr ein System *sui generis*, über dessen Bedeutung und Ausbildung bislang noch wenig Aussagen gemacht werden konnten.

Diese Kontinuitätslehre ist mit Sicherheit durch folgende Tatsachen zu stützen:

1. Die Algen besitzen zum größten Teil Chromatophoren, welche offensichtlich von Generation zu Generation persistieren, sich nur durch Teilung vermehren und keine Entwicklungsmetamorphose durchmachen. Bei höheren Algenformen, wie bei den Fucales, Sphacelariales, Laminariales und Florideen, verhalten sich die Plastiden ähnlich wie bei den höheren Pflanzen. In den Scheitelzellen von *Halopteris filicina* konnten durch Oltmanns (1889) und Homes (1929) Proplastiden nachgewiesen werden, welche farblos sind und im Zuge der Segmententwicklung eine Metamorphose zu funktionstüchtigen Phaeoplasten durchmachen. Offenbar geht mit dem Prinzip des Scheitelzellenwachstums schon bei den Algen der entwicklungsgeschichtlich bedeutende Schritt vor sich, nämlich die Einschaltung einer Embryonalphase der Plastiden und damit zwangsläufig verbunden eine Entwicklungsmetamorphose derselben hinsichtlich ihrer Gestalt, Größe, Struktur und physiologischen Funktion. Ganz ähnlich verhalten sich auch die Characeen. Alle Beobachtungen an Algen stützen die Lehre von der Kontinuität der Plastiden im Sinne der Schimper-Meyerschen Konzeption mit einem sehr eindeutigen Gewicht.

2. Die Moose und Farne zeigen ebenfalls im Pflanzenreich eine Sonderstellung. Durch Scherrers (1913, 1914) und Sapêhins (1911, 1913) Untersuchungen ist es hinlänglich erwiesen, daß die Plastiden der Moose persistieren und kontinuierlich von Zelle zu Zelle im Zuge der Entwicklung verfolgt werden können. Bei den Pteridophyten sind *Selaginella* und *Isoëtes* (Ma 1928, 1930, Emberger 1920 a, b, c, d, 1921, 1922 a, b) so gut untersucht, daß auch hier alle Befunde die Theorie von der Kontinuität der Plastiden eindeutig positiv belegen. Neuerdings untersuchte Kaja (1954) eine Reihe von Moosen und konnte mit neuesten optischen Hilfsmitteln die Individualität und Kontinuität der Moosplastiden völlig sicherstellen.

3. Bei den Blütenpflanzen liegt zweifellos die fortgeschrittenste Stufe der Plastidenentwicklung vor uns. Der bei den höheren Algen mit Scheitelzellen eingeschlagene Weg der Einschaltung einer besonders reduzierten Embryonalphase der Plastiden wird hier zum beherrschenden Prinzip.

In den Meristemzellen der Blütenpflanzen gibt es keine fertigen Plastiden. Ebenso wie der Kern charakteristische embryonale Eigenschaften besitzt, sind in den Meristemen auch die Plastiden hinsichtlich ihrer

Gestalt, Struktur und Funktion in einem embryonalen Zustand. Sie sind so reduziert, daß sie in Größe und Gestalt ganz den Chondriosomen gleichen können. In diesem Punkt setzt die Unsicherheit der Beweisführung für die Theorie von Meyer und Schimper ein. Könnte es gelingen, den Nachweis zu führen, daß die Proplastiden andere Eigenschaften besitzen als die ähnlichen Chondriosomen, so wäre die Meyer-Schimper'sche Lehre auch für die Blütenpflanzen gefestigt.

Dieser Nachweis ist aber bis heute nicht zwingend erbracht worden, und nur wegen dieser Frage wird die Lehre von der Kontinuität der Plastiden in der Literatur immer wieder modifiziert oder angezweifelt.

Aber auch bei den Blütenpflanzen gibt es unabhängig vom Chondriosomen-Proplastiden-Problem Tatsachen, welche für die Kontinuitätslehre sprechen. Die Plastiden der Blütenpflanzen können sich nämlich nur durch Teilung vermehren, wodurch eine Parallele zu den klaren Befunden an Algen hergestellt ist. Ferner konnte durch die genetischen Arbeiten von Correns (1919, 1924, 1931) und Renner (1934) der Beweis erbracht werden, daß es einen Plastidenerbgang gibt.

Auf Grund der überzeugenden Befunde, welche für die Lehre von Schimper und Meyer sprechen, haben auch die Anhänger der Chondriosomentheorie einige Anpassungen vornehmen müssen (Guilliermond 1933). Während Guilliermond (1911—1920) in seinen ersten Arbeitsserien die Meinung vertritt, daß aus jedem Chondriosom ein Plastid werden könne, kommen er (1920) und Dangeard (1918, 1919 a, b) später zur Auffassung, daß es zweierlei Chondriosomen gebe. Auch Emberger (1920), Mangenot (1920), Beauverie (1928), Zirkle (1929) vertraten einen ähnlichen Standpunkt. Einerseits würden in den embryonalen Zellen Chondriosomen existieren, welche sich nicht zu Plastiden entwickeln und unverändert in die Dauerzelle übernommen werden, und andererseits gäbe es solche Chondriosomen, welche zu Plastiden werden können. Damit ist aber eine Annäherung an die Auffassung von Schimper und Meyer vollzogen. Wenn nach der älteren Auffassung Guilliermonds statt Proplastid der Ausdruck Chondriosom schlechthin zu setzen wäre, so ist nach der neueren Auffassung Guilliermonds und seiner Schule insofern eine Annäherung an die klassische Theorie festzustellen, als man zur Annahme einer besonderen plastidogenen Chondriosomengruppe gezwungen wäre. Die Metamorphosenlehre der Klassiker bleibt aber dabei völlig unberührt.

Bei diesem Stande der Forschung war es an der Zeit, mit neuzeitlichen Mitteln und Erfahrungen das Problem der Proplastiden aufzugreifen. Dies erscheint um so notwendiger, als unsere Kenntnisse über die Struktur des fertig entwickelten Chloroplasten innerhalb der letzten 20 Jahre durch die Arbeiten von Heitz (1932, 1936, 1937), Dautreline (1935), Menke (1938 a, b, c, 1939, 1940 a, b), Geitler (1937), Frey-Wyssling (1938 a, b), Frey-Wyssling u. Wuhrmann (1947), Frey-Wyssling u. Mühlethaler (1949) und Strugger (1936, 1947, 1950, 1951) eine bedeutende Vertiefung erfuhren. Im Gegensatz dazu ist über die embryonale Phase der Chloroplasten sehr wenig bekannt. Es liegen kaum neuere Erfahrungen darüber vor, und von einer Kenntnis der Entwicklungsgeschichte der Pla-

stiden kann in der gegenwärtigen botanischen Wissenschaft noch keine Rede sein.

Die vorliegende Arbeit soll sich zunächst nur mit den Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* befassen. Für diese schwierigen Untersuchungen eigneten sich die Liliifloren besonders gut. Parallel dazu ist auch den Chondriosomen eine verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Die hier niedergelegten Untersuchungen sollen die methodischen und sachlichen Grundlagen für eine weitere Bearbeitung der Entwicklungsgeschichte der Plastiden bei Anthophyten liefern.

I. Beobachtung an lebenden Zellen

Um das Problem der Proplastiden zu bearbeiten, war es zunächst notwendig, von Lebenduntersuchungen auszugehen. Schon im Hinblick auf die kritische Bewertung der Fixierresultate war die Kenntnis der Verhältnisse in der lebenden Zelle von großer Bedeutung.

Die Technik dieser Untersuchungen bestand darin, daß junges, sorgfältig isoliertes Blattmaterial aus dem Trieb von *Agapanthus umbellatus* im Monat August, also zu einer sehr günstigen Jahreszeit, gewonnen wurde. Es wurden mit einem sehr guten Rasiermesser mit möglichst schonender Schneidetechnik von der Blattoberseite oder Blattunterseite jugendlicher Blätter an den ausgewählten Regionen Flächenschnitte angefertigt. Diese wurden mit der Schnittfläche nach oben sofort in eine 0,05 mol. Traubenzuckerlösung, hergestellt mit Leitungswasser, auf dem Objektträger eingelegt und mit einem extra dünnen Deckglas unter Vermeidung eines schädigenden Adhäsionsdruckes bedeckt. In einem kleinen Rezipienten (vgl. Strugger 1949) wurde die Interzellularenluft mit Hilfe einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe durch das Medium ersetzt. Das Präparat ist dann für die Untersuchung vorbereitet.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem großen binokularen Forschungsmikroskop von Leitz unter Benutzung der Immersionsobjektive 100fach 1/12 n. A. 1,3 und dem Fluoritimmersionssystem 114fach 1/16 n. A. 1,32. Als Lichtquelle bewährte sich eine sehr lichtstarke Niedervoltmikroskopierleuchte von Winkel-Zeiss bestens. Je nach Bedarf wurden Farbfilter oder Milchglas-scheiben eingeschaltet. Die Mikroskopierarbeit erfolgte im völlig verdunkelten Arbeitsraum.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Darstellung entwicklungsgeschichtlich nach dem Alter der untersuchten Blätter geordnet und umfassen die embryonalen Proplastiden bis zum ersten Ergrünungsstadium in der Streckungszone.

Sehr junges, ½ cm langes, weißes Blatt

Die Mesophyllzellen solcher Blätter sind noch postmeristematisch. Ihre Länge beträgt durchschnittlich 20 bis 30 μ . Die Suche nach den Proplastiden ist durch den Stärkereichtum derselben wesentlich erleichtert. Die Zellen enthalten nämlich sehr viele Stärkekörner von wechselnder Größe (0,7 bis 6 μ), welche Stoffreserven für das zukünftige Differenzierungs- und Streckungswachstum der Mesophyllzellen darstellen. Mit Hilfe der Jodreaktion läßt sich die Stärkenatur dieser Körner leicht belegen. Eine nähere Be-

trachtung der Schnitte mit der Ölimmersion gestattet es, die durch die Schneidetechnik geschädigten Zellen von den noch lebenden auseinanderzuhalten.

Solche Zellen, in denen das Cytoplasma nicht mehr strömt und in denen der Zellkern grob koaguliert oder gar pyknotisch verändert ist, waren immer stark geschädigt. Auch die Stärkekörner in den geschädigten Zellen waren aus ihrem protoplasmatischen Zusammenhang befreit und zitterten in reger Brownscher Molekularbewegung. Im Gegensatz dazu waren in Zellen, in denen eine Cytoplasmaströmung sichtbar war, die Kerne schwach lichtbrechend und regelmäßig granuliert. Auch die Stärkekörner bewegten sich in den lebenden ungeschädigten Zellen niemals in Brownscher Molekularbewegung. Die Cytoplasmakonfiguration in diesen Zellen war normal, und das Ausbleiben der Brownschen Molekularbewegung der Stärkekörner erklärt sich durch die Erhaltung des Proplastidenstromas, welches die Stärkekörner umschließt.

Auf Grund dieser Symptome ist es möglich, einwandfrei lebende Zellen auf ihren Bestand an Proplastiden mikroskopisch zu analysieren. Da die Stärke nur im Stroma eines Proplastids entstehen kann, wird durch die Stärkekörner die Lage der Proplastiden angezeigt. Meist liegen die Körner recht charakteristisch. Entweder ist ein großes Stärkekorn allein liegend zu beobachten, oder es ist eine Gruppe von zwei oder vielen Stärkekörnern in Form von Aggregaten vereinigt. Aus dieser Beobachtung kann der Schluß gezogen werden, daß die Proplastiden in den embryonalen Zellen von *Agapanthus* entweder nur eines oder auch mehrere Stärkekörner in ihrem Stroma führen.

Die Beobachtung des Stromas *in vivo* stößt auf erhebliche Schwierigkeiten. Sind die Stärkekörner sehr groß, so ist das Stromaplasma so dünn ausgespannt, daß eine objektive Feststellung seiner Existenz *in vivo* meist nicht möglich ist. Günstigere Resultate lieferte dagegen eine sorgfältige mikroskopische Analyse derjenigen Proplastiden, welche entweder nur ein kleines Stärkekorn oder zwei oder drei kleinere Stärkekörner führen (Abb. 1 a). Deutlich ist ein Proplastidenstroma zu erkennen, welches das Stärkekorn völlig umgibt und an einer Seite einen kompakten, pseudopodienähnlichen Fortsatz bildet. Es ist optisch vollkommen homogen, farblos und unterscheidet sich in seiner Lichtbrechung deutlich vom Cytoplasma. In Abb. 1 b ist ein Proplastid dargestellt, welches ein größeres und zwei kleinere Stärkekörner umschließt. Auch hier ist die Existenz des Proplastidenstromas *in vivo* deutlich zu erkennen. Die gemessenen größten Längen dieser Gebilde seien in einigen Zahlen niedergelegt: 5,4; 2,3; 1,5; 1,9 μ .

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Proplastiden in den embryonalen Mesophyllzellen von *Agapanthus*blättern keine feste charakteristische Form und konstante Größe besitzen. Einerseits ist das Stroma

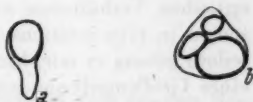


Abb. 1. Amyloplastische Proplastiden aus einem sehr jungen, etwa $\frac{1}{2}$ cm langen Blatt von *Agapanthus umbellatus*. In a enthält das Stroma ein großes Stärkekorn. In b sind drei Stärkekörner vom Stroma umschlossen.

amöboid veränderlich gestaltet, und andererseits treten durch den verschiedenen Grad der Stärkespeicherung wechselnde Zwangsformen in Erscheinung. Die cytologische Individualität steht aber außer Zweifel.

In den embryonalen Mesophyllzellen sind die Proplastiden vornehmlich in den Dienst der Reservestärkespeicherung gestellt. Sie haben also den Charakter von Amyloplasten, weshalb auch Schimper (1885) sie als Leukoplasten bezeichnet hat. Es scheint aber zweckmäßig zu sein, diese Leukoplastenfunktion, welche nur vorübergehender Natur ist, nicht als Richtlinie für die Nomenklatur zu wählen. In Übereinstimmung mit dem Vorgehen Randolph's (1922) und Bowen's (1928, 1929 a, b) ist es besser, vom entwicklungsgeschichtlichen Standpunkt aus diese Organelle als Proplastiden zu bezeichnen, da es außer Zweifel ist, daß aus ihnen später die Chloroplasten entstehen.

Im Hinblick auf die Chondriosomentheorie war es wichtig, auch die Chondriosomen am selben Objekt *in vivo* zu untersuchen. Die Beobachtungen waren sehr schwierig. Infolge der Kleinheit der Zellen und ihrer starken Überfüllung mit den lichtbrechenden Stärkekörnern waren die optischen Verhältnisse so ungünstig, daß eine Beobachtung der Chondriosomen *in vivo* meistens unmöglich schien. An besonders günstigen Stellen jedoch gelang es mir, kleine ovale Stäbchen und kugelförmige Gebilde von einer Größenordnung um 1μ in lebenden Zellen im Cytoplasma zu beobachten, welche sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Form sich deutlich von den stärkeführenden Proplastiden unterschieden. Sie führen keine Stärke und sind in der Ausbildung ihrer Umrißformen konstanter als die stark veränderlichen Proplastiden. Am fixierten Material war es wesentlich leichter, an Hand von Mikrotomschnitten die Existenz des Chondrioms in jüngsten Zellen zu belegen (vgl. S. 150).

Untersuchungen an 1 cm langen Blättern

Ein solches Blatt ist völlig weiß und zeigt schon äußerlich einen wenig differenzierten Charakter. Flächenschnitte wurden in 0,1 bis 0,05 mol. Glukoselösung eingelegt und sorgfältigst mikroskopiert. Die Zellen des Mesophylls sind noch sehr klein (20 bis 40μ) und haben noch keine starke Streckung erfahren, nur die Prokambiumstränge sind klar prosenchymatisch ausgebildet.

Neben den großen meristematischen Kernen sind die reichlich vorhandenen Stärkekörner die auffallendsten Inhaltskörper. Sie liegen entweder als große Körner einzeln oder, wenn sie klein sind, erscheinen sie zu charakteristischen Gruppen zusammengefaßt. Die nähere Untersuchung dieser Zellen ergab dieselben Verhältnisse wie in jüngerem Material. Auch hier führen die Proplastiden Stärkekörner in wechselnder Zahl und Größe. Deutlich ist das die Stärke umhüllende Plastidenstroma an besonders günstigen Proplastiden zu beobachten.

In diesen Blattsschnitten konnte ich eine Reihe intakter Mesophyllzellen finden, welche gerade Teilungsstadien erkennen ließen. Im Hinblick auf

das Verhalten der Proplastiden war die Anaphase besonders lehrreich. Wie die Abb. 2 zeigt, verteilen sich die Proplastiden in der Anaphase streng polar, so daß sie in Gruppen in den Cytoplasma-Ansammlungen an den Spindelpolen liegen. Durch diesen Mechanismus (vgl. Marquette 1907) ist eine gleichmäßige Versorgung der Tochterzellen mit Proplastiden gewährleistet. In prophasischen Zellen ist eine polare Lage der Proplastiden noch nicht feststellbar. Sie tritt erst ein, wenn im Zusammenhange mit der Ausbildung der Spindel die Metaphase beginnt. Die Vitalität der beobachteten Erscheinungen konnte eindeutig durch die Feststellung des Weiterlaufens der Kern- und Zellteilung bewiesen werden.

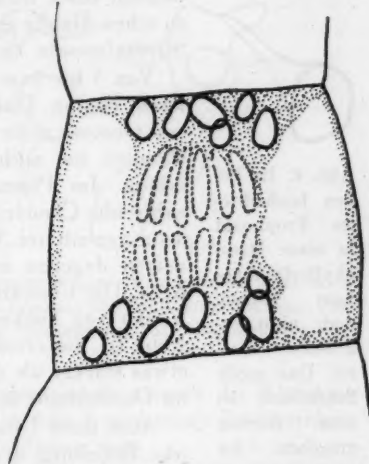


Abb. 2. Lebende Zelle aus dem Mesophyll eines 1 cm langen Blattes in Teilung. Die Proplastiden sind an beiden Zellpolen während der Anaphase relativ gleichmäßig verteilt.

An Flächenschnitten in 0,05 mol. Glukoselösung wurde der Versuch unternommen, neben den Proplastiden die Chondriosomen zu beobachten. Die optischen Verhältnisse wären an einigen lebenden Zellen so günstig, daß die Existenz der Chondriosomen in vivo unter Beweis gestellt werden konnte. Bei Beobachtung im grünen Licht heben sich die Chondriosomen als graue Gebilde vom Cytoplasma ab. Sie sind kugelförmig, oval, hantelförmig oder als kleine Stäbchen ausgebildet. Ihre Breite schwankt zwischen 0,3 bis 0,5 μ , ihre Länge zwischen 0,7 bis 1,2 μ . Abb. 3 stellt einige Formen dar.

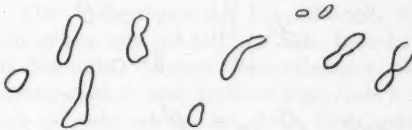


Abb. 3. Chondriosomen aus den Mesophyllzellen eines 1 cm langen Blattes. Lebendbeobachtung. Die Chondriosomen führen niemals Stärke.

Es besteht kein Zweifel, daß die stärkeführenden Proplastiden sowohl in ihrer systrophischen Lage um den Zellkern als auch in bezug auf ihre Größe und Form sich gegenüber den Chondriosomen grundverschieden verhalten. Die Chondriosomen sind im Cytoplasma recht gleichmäßig verteilt.

Untersuchungen an 3 cm langen, noch rein weißen Blättern

Da Blätter von dieser Länge schon eine zonale Gliederung zeigen, wurde sowohl die Basis als auch die mittlere Blattregion einer Vitalanalyse unterzogen. Die Basalregion enthält Proplastiden mit reichlichen und großen Stärkekörnern. Diese Region verhält sich in allen Einzelheiten

so wie das vorhin beschriebene jüngere Blattmaterial. Auch in der mittleren Blattregion ist die Ausbildung der Stärkekörner noch bedeutend. Im allgemeinen war, wenn die Stärkekörner nicht zu groß sind, das Vorhandensein eines umhüllenden Stromas in diesen Zellen gut zu sehen. Häufig ist ein oft längerer pseudopodienähnlicher Stromafortsatz an einer Seite ausgebildet (vgl. Abb. 4).



Abb. 4. Im Leben beobachtetes Proplastid in einer Mesophyllzelle eines 3 cm langen, noch nicht ergrüntes Blattes. Das große Stärkekorn ist vom Stroma umgeben. An einer Seite ein amöboider, pseudopodienähnlicher Stromafortsatz.

Von 3 bis 5 cm langen Blättern wurden aus der mittleren Region Flächenschnitte in einer 0,05 mol. Lösung von Glukose unter den optisch besten Bedingungen mikroskopiert, um auch die Chondriosomen *in vivo* zu beobachten. Im Plasma der lebenden Mesophyllzellen sind zahlreiche Chondriosomen oft recht gleichmäßig oder inselartig verteilt im Wandbelag zu sehen. Die Proplastiden neigen dagegen mehr zur systrophischen Lage um den Kern. Die Chondriosomen sind oval oder stäbchenförmig. Ketten von kokkenartigen Gebilden sind zu sehen (vgl. Abb. 5). Sie erscheinen homogen und brechen das Licht etwas stärker als das Cytoplasma. Ihre Dimensionen sind im Durchschnitt 0,3 bis 1,2 μ .

Auch diese Untersuchungen ergaben keine morphologische Beziehung der Chondriosomen zu den stärkeführenden Proplastiden.

Untersuchungen an 7 cm langen Blättern

Von einem 7 cm langen Blatt, dessen oberes Drittel schon blaß ergrünt war und dessen unterer Teil rein weiß erschien, wurde ein Flächenschnitt aus dem mittleren Teil der noch weißen Region von der Oberseite angefertigt und in Leitungswasser mit der Schnittfläche nach oben liegend infiltriert und untersucht.

Die Zellstreckung ist in diesem Material schon im Gange. Große zentrale Zellsafträume sind ausgebildet und eine Teilungstätigkeit im Mesophyll ist nicht mehr zu beobachten. Nicht nur die Zellen haben ihren post-embryonalen Habitus eingebüßt, auch die Proplastiden sind gegenüber den embryonalen Zellen der früher untersuchten Blätter grundsätzlich verändert. Die

allermeisten Proplastiden haben ihre Stärkekörner verloren. Nur vereinzelt treten noch stärkeführende Proplastiden in Erscheinung. Lediglich das Stroma ist sichtbar, so daß die stärkefreien Proplastiden mit Sicherheit im peripheren Plasma oft zu Gruppen vereint liegend zu beobachten



Abb. 5. Im Leben beobachtete Chondriosomen aus den Mesophyllzellen eines 3 cm langen, noch nicht ergrüntes Blattes.

sind. Sie erscheinen bei günstiger Blendeneinstellung als homogene, etwas dunkle Gebilde im helleren Cytoplasma. Sowohl ihre Größe als auch ihre

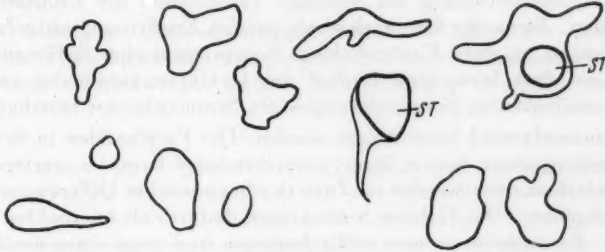


Abb. 6. Aus lebenden Mesophyllzellen herausgezeichnete Proplastiden eines etwa 7 cm langen Blattes (oberes Drittel). Die Proplastiden sind zum größten Teil stärkefrei, nur gelegentlich sind einzelne Stärkekörner (St) eingeschlossen.

Gestalt sind sehr wechselnd. Sie erreichen jedoch niemals die Kleinheit der parallel sichtbaren Chondriosomen. In Abb. 6 sind einige Proplastiden, welche den beobachteten Formenkreis umfassen, herausgezeichnet. In Abb. 7 sind parallel dazu Chondriosomen aus denselben Zellen dargestellt. Während die Chondriosomen in ihrer Form relativ starr sind, zeigen im Gegensatz dazu die Proplastiden einen ständig in Minutenzeiträumen ablaufenden amöboiden Wechsel ihrer Form. Führen einzelne Proplastiden noch Stärke, so ist ihr Stroma als Hülle um das Stärkekorn sichtbar und an einer Seite meist pseudopodienähnlich ausgezogen und ebenfalls einem amöboiden Formwechsel unterworfen.

Die Änderungen der Umrißformen der Proplastiden gehen sehr schnell vor sich. Innerhalb von 5 bis 10 Sekunden können Vorwölbungen, Abrundungen, Kantigwerden und In-die-Länge-Ziehen eintreten, so daß es recht schwer ist, diese Formänderungen niederzulegen.

Abb. 8 gibt eine Reihe, in annähernd Halbminutenabständen gezeichnet, wieder. Dieser Formwechsel deutet klar darauf hin, daß das Stroma recht

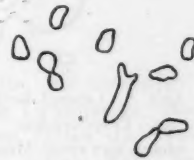


Abb. 7. Im lebenden Zustand herausgezeichnete Chondriosomen aus dem Mesophyll eines etwa 7 cm langen Blattes (oberes Drittel).



Abb. 8. Die Amöboidie eines lebend beobachteten Proplastids aus einer Mesophyllzelle eines etwa 7 cm langen, noch nicht ergrüntes Blattes (oberes Drittel).

flüssig sein muß und noch keine feste Struktur wie beim fertigen Chloroplasten besitzt.

Neben diesen Formänderungen ist auch im klaren Zusammenhang mit der Cytoplasmaströmung ein ständiger Ortswechsel der Proplastiden zu beobachten. Wenn der Ortswechsel als passive Erscheinung aufgefaßt werden kann, so ist mein Eindruck beim Formwechsel eher dafür sprechend, daß neben dem formenden Einfluß der Cytoplasmaströmung auch noch aktive, amöbenartige Formänderungen des Stromaplasmas beteiligt sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Proplastiden in den Zellen der Streckungszone haben ihren embryonalen Charakter verloren. Die Reservestärkemassen werden im Zuge der beginnenden Differenzierung zunächst abgebaut. Das farblose Stroma wird dadurch als kompaktes Gebilde sichtbar. Es erscheint in vivo völlig homogen und zeigt einen amöbenähnlichen, ständigen Formwechsel. Sowohl

der Größe nach als auch in bezug auf die Formeigentümlichkeiten sind die Plastiden von den Chondriosomen grundverschieden. Eine Verwechslung von Proplastiden und Chondriosomen ist in vivo auch an diesem Zellmaterial nicht möglich.

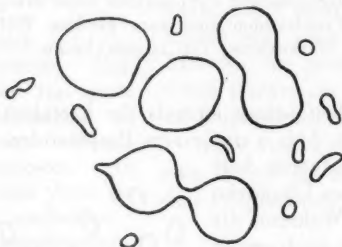


Abb. 9. Lebend beobachtete Gruppe von Proplastiden und Chondriosomen aus einer Mesophyllzelle eines 10 cm langen Blattes (basale Zone). Der Unterschied zwischen Proplastiden und Chondriosomen ist eindeutig.

Untersuchungen an 10 bis 50 cm langen Blättern

Diese Blätter sind bereits sehr deutlich zoniert. Das obere Drittel ist kräftig ergrünt. Basalwärts folgt eine blaß gelbgrüne, dann eine gelbe Zone, welche schließlich in die basale weiße Blattpartie übergeht.

Um die Proplastiden unmittelbar vor ihrer Metamorphose zu Chloroplasten zu studieren, wurden Flächenschnitte von der weißen Zone bis zur gelben Zone beobachtet. Dann wurden auch aus der blaßgrünen Zone Schnitte untersucht, um festzustellen, ob die auftretenden Pigmente eine bestimmte Lokalisation erkennen lassen. Als Medium für diese Untersuchungen eignete sich reines Leitungswasser besser als Zuckerlösungen.

Die Analyse an Flächenschnitten aus der weißen basalen Blattzone ergab folgende Resultate:

Im Plasmawandbelag sind nunmehr relativ leicht die völlig stärkefreien Proplastiden zu beobachten. Sie liegen häufig in Gruppen oder paarweise. Abb. 9 gibt eine solche Stelle wieder. Die Form der Proplastiden ist wechselnd. Rundliche, ovale, bisquitförmige Gestalten sind häufig. Neben den Proplastiden sind die Chondriosomen im Cytoplasma recht gleichmäßig verteilt. Sie sind immer kleiner als die Proplastiden und erscheinen als kleine Kugeln, Stäbchen oder Hanteln.

Während die Form der Proplastiden in vivo einem ständigen amöboiden Wechsel unterworfen ist, konnte an den Chondriosomen ein derartiger Formwechsel in kürzeren Zeitabständen niemals beobachtet werden.

Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal ist aber der bedeutende Größenunterschied zwischen den Proplastiden und Chondriosomen. Tab. 1 gibt einige Zahlenwerte, welche am lebenden Material gewonnen wurden.

Tab. 1. 18 cm langes Blatt von *Agapanthus umbellatus*. Messungen an Mesophyllzellen der weißen Basalzzone. Angaben in μ .

Proplastiden		Chondriosomen	
Größte Länge	Größte Breite	Größte Länge	Größte Breite
2,6	1,4	0,6	0,6
3,2	1,2	1,4	0,5
2,0	1,6	0,8	0,6
2,8	2,0	1,2	0,6
4,0	2,4	1,6	0,6
1,4	1,4	1,6	0,6
5,2	1,6	1,6	0,8

Die Proplastiden erscheinen in vivo völlig strukturlos. Sie unterscheiden sich lediglich durch eine andere Lichtbrechung vom Cytoplasma. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß in geschädigten Zellen die Proplastiden langsam verquellen. Dann konnten in jedem Fall im Proplastid ein oder zwei scheibchenförmige Einschlüsse beobachtet werden.

Die Chondriosomen dagegen blieben auch in geschädigten Zellen strukturlos. Sie runden sich während der Quellung ab und lösen sich förmlich auf.

Die Prüfung von Schnitten aus der blaßgrünen Zone, in der die Ergrünung eben beginnt, ergab sehr aufschlußreiche Bilder. Auch hier war reines Leitungswasser das beste Untersuchungsmedium. Die Proplastiden sind in ihrer Form und Größe gegenüber denen in der weiß-gelben Zone nicht verändert. Auch die Amöboidie ist sehr stark ausgeprägt. Die Pigmente sind nicht homogen im Stroma verteilt, sondern in kleinen scheibchenförmigen Strukturelementen lokalisiert, welche meist in Ein- oder Zweizahl in jedem Proplastid durch die Pigmentierung deutlich sichtbar werden. Sehr häufig sind zwei eng parallel gelagerte grüne Scheibchen sichtbar. Seltener ist die Zahl der Scheibchen 3 oder mehr. In Abb. 10 ist eine Gruppe von ergrünenden Proplastiden nach dem Lebendpräparat herausgezeichnet. Das Stroma ist völlig homogen, enthält aber bei einzelnen Proplastiden Vakuolen, deren Umriß sich im Zuge der amöboiden Formänderung ständig verändert.

Die Chondriosomen, von denen zwei in Abb. 10 vergleichsweise eingezeichnet sind, erscheinen unverändert. Sie lassen weder eine Amöboidie noch einen Einschluss erkennen.

Zur Sicherung dieser Befunde wurden lebende, soeben ergrünende Proplastiden mit dem großen Fluoreszenzmikroskop von Zeiß mit bester Immersionsoptik auf die Chlorophyllverteilung hin untersucht. Das Ergebnis war eindeutig. Nur die scheibchenförmigen Einschlüsse ließen eine rote Chlorophyllfluoreszenz erkennen. Das

Stroma der Proplastiden sowie die Chondriosomen sind chlorophyllfrei.

Es besteht sonach kein Zweifel, daß die hier als Proplastiden gedeuteten Gebilde beim Ergrünen zur

Chlorophyllbildung befähigt sind. Es ist fernerhin evident, daß die Chondriosomen ein besonderes System darstellen und nichts mit der Chloroplastenentstehung zu tun haben.

In den Proplastiden ist in vivo nach der Ausbildung der Pigmente das Vorhandensein sehr kleiner scheibchenförmiger Strukturelemente nachzuweisen, welche den Ort der Pigmentanreicherung darstellen. Im

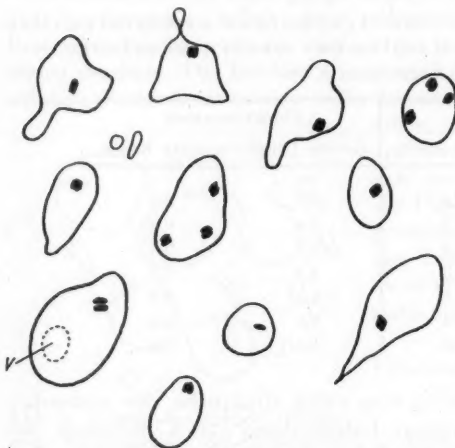


Abb. 10. Eine Gruppe ergrünender Proplastiden, im lebenden Zustand gezeichnet. 18 cm langes Blatt (blaßgrüne Zone). Im homogenen amöboiden Stroma sind regelmäßig pigmentierte Granascheibchen zu beobachten. Vereinzelt führt das Stroma eine stark veränderliche Vakuole (V).

Vergleich zum fertigen Chloroplasten können diese Scheibchen unbedenklich als Grana bezeichnet werden. Da sie hier in Ein- oder Zweizahl auftreten, sollen diese Grana „primäre Grana“ genannt werden.

Die Aufgabe der nun folgenden Untersuchungen besteht darin, die Frage zu prüfen, ob auch im nicht ergrünenden Zustand in jungen Blattgeweben die Proplastiden regelmäßig primäre, noch nicht pigmentierte Grana führen.

Untersuchungen mit Hilfe der Vitalfärbung mit Rhodamin B

In den Zellen etiolierter Blätter von *Helodea* konnte ich (1936 a, b) die Plastiden mit Rhodamin B vital färben. Es zeigte sich, daß jedes etiolierte Plastid aus einem amöboiden Stroma und einem mit Rhodamin B elektiv färbbaren Granum besteht. Diese Vitalfärbung gelang am besten an möglichst ausgewachsenen Zellen. In junge *Helodea*blätter vermag das

Rhodamin B kaum einzudringen. Daher war es bei den Untersuchungen an *Agapanthus* ratsam, die weiße Basis älterer Blätter zu den Vitalfärbungsuntersuchungen heranzuziehen.

Ein etwa 37 cm langes Blatt wurde aus dem Trieb vorsichtig herauspräpariert. Von der noch weißen Basis des Blattes dicht an der Ergrünungszone wurden von der Blattunterseite Flächenschnitte angefertigt, in einer Rhodamin-B-Lösung in Leitungswasser, welche 0,15 Mol Rohrzucker enthielt, mit Hilfe der Vakuuminfiltrationsmethode infiltriert und in einem Schälchen 10 bis 30 Minuten in der Farblösung belassen.

Die mikroskopische Analyse erfolgte an Präparaten, welche in dieser Farblösung auf dem Objektträger lagen. Es wurde ein Grünfilter vor der Beleuchtungseinrichtung angebracht, um elektiv rotgefärbte Gebilde in optimalem Kontrast beobachten zu können. Die Flächenschnitte wurden von der Schnittfläche aus beobachtet. Dabei sind die oberflächlichen Mesophyllzellen getötet oder weitgehend geschädigt. Erst in den tiefer gelegenen Zellschichten sind intakte Zellen mit normalen Kernen, Proplastiden, Chondriosomen und normaler Cytoplasmaströmung anzutreffen. Diese Zellen wurden nach 10 bis 30 Minuten langer Färbezeit sorgfältig mit bester Objektvoptik beobachtet. Die Proplastiden sind amöboid geformte, etwas stärker lichtbrechende Gebilde, welche sowohl durch ihre Größe als auch durch ihre Form sich klar von den stäbchenförmigen oder ovalen bis runden kleinen Chondriosomen unterscheiden. Das Stroma ändert in lebenden Zellen dauernd seine Form, was für die Chondriosomen nicht zutrifft.

Die Vitalfärbung mit Rhodamin B ergibt bei solchen, sicher im vitalen Zustand beobachteten Proplastiden folgendes Resultat:

Das Stroma scheint sich nicht anzufärben. Es ist höchstens eine leichte diffuse Vertiefung des Grautones im grünen Licht wahrnehmbar, was auf eine diffuse Verteilung geringer Lipoidmengen hinweist (vgl. die Ausführungen von Frey-Wyssling und Mühlethaler 1949). Sehr regelmäßig ist in Zellen, welche den Farbstoff gut aufgenommen haben, ein mit Rhodamin B stärker und elektiv färbbarer Einschlusskörper im Stroma der Proplastiden zu sehen, welcher sich recht gut als sehr kleines, etwa $0,5 \mu$ großes Gebilde vom helleren Stroma schwarzgrau abhebt. Die Gestalt dieses Einschlusses ist die eines kleinen Scheibchens. Von der Fläche gesehen erscheint es rund, von der Seite strichförmig. Abb. 11 gibt einige herausgezeichnete Proplastiden wieder. Auffallend ist die Regelmäßigkeit, mit der diese färbbaren Gebilde in der Einzahl in den Proplastiden anzutreffen sind. In manchen Zellen treten relativ häufig Proplastiden auf, in denen regelmäßig zwei kleine Scheibchen nachweisbar sind. Diese liegen dann in der Seitenansicht meist parallel zueinander. Diese schwierigen Beobachtungen konnten durch zahlreiche Beobachtungsserien sichergestellt werden.

An den mehr oder weniger geschädigten Zellen der Schnitte ist unmittelbar zu Beginn des Färbevorganges in den leicht aufgequollenen Proplastiden die Existenz färbbarer Scheibchen im Stroma in Einzahl oder Zweizahl recht leicht nachzuweisen, da das Rhodamin B in solche Zellen schneller eindringt. Die Zuckerlösung verhindert dabei ein zu schnelles Zerfließen der aufquellenden geschädigten Proplastiden. Die Chondriosomen zeigen nach

der Rhodamin-B-Färbung einen diffusen, dunkleren Grauton im grünen Licht (vgl. Strugger 1938). Niemals konnte ich in ihnen elektiv gefärbte Gebilde nachweisen. Demnach ergibt auch das Vitalfärbungsbild einen tiefgreifenden Unterschied zwischen Proplastiden und Chondriosomen.

Im Hinblick auf die Beobachtungen, welche ich 1936 mit Rhodamin B an etioliierten Plastiden und an einigen Leukoplasten erarbeiten konnte, schlage ich vor, die in den Proplastiden nachweisbaren Scheibchen als primäre Grana zu bezeichnen. Diese Identifizierung ist gerechtfertigt, weil in den ergrünenden Proplastiden von *Agapanthus* das Chlorophyll in die-

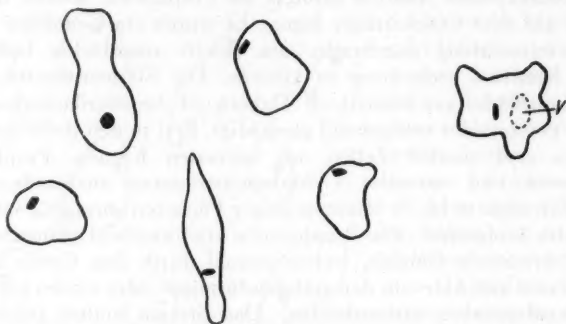


Abb. 11. Mit Rhodamin B vitalgefärbte Proplastiden aus der Basis eines 37 cm langen Blattes. Jedes Proplastid enthält ein stark färbbares primäres Granum. V: eine Vakuole.

sen Scheibchen auftritt. Die Parallele zu meinen Beobachtungen an *Helodea* 1938 ist also evident.

Die Proplastiden von *Agapanthus* bestehen demnach aus einem lipoidarmen, amöboiden Stroma, in welchem sich regelmäßig ein lipoidreiches, scheibchenförmiges primäres Granum befindet, welches im ersten Stadium des Ergrünens den Ort der Pigmentanhäufung darstellt.

II. Die Fixierung und Färbung der Proplastiden

Voruntersuchungen an Handschnitten

Für den weiteren Fortgang der Entwicklung einer Cytologie der Plastiden ist das Fehlen einer brauchbaren Fixierungs- und Färbungsmethode ein besonders wichtiges Problem. Während die cytologische Methodik für den Kern und seine Chromosomen in erfolgreichster Weise hochentwickelt wurde, hat man die Plastiden recht weitgehend aus dem Gesichtskreis verloren. Innerhalb der Ära der Chondriosomenforschung hat man der Fixierungs- und Färbetechnik der Chondriosomen ein stärkeres Interesse entgegengebracht und zeigen können, daß für das Chondriom ganz besondere Fixierungs- und Färbevorschriften notwendig sind, welche sich von der Technik der Kern- und Chromosomendarstellung in wesentlichen Punkten unterscheiden. Vorwegnehmend, daß die Proplastiden weitgehend mit den

Chondriosomen identisch seien, hat man bedenkenlos die „méthodes mitochondriales“ in das Gebiet der Proplastidenforschung übernommen und aus den erhaltenen Bildern sehr weitgehende Schlüsse gezogen. Dabei hat kein Autor die grundsätzliche Frage kritisch untersucht, ob diese Präparationsmethoden für Chondriosomen an den Proplastiden wirklich naturgetreue Resultate lieferten. Erst wenn diese Frage geklärt ist, kann über die Resultate der „Chondriosomenshule“ eine Aussage gemacht werden.

Nach dem bisherigen Stand der Plastidenforschung war es notwendig, ganz von vorne anzufangen und langsam aufbauend eine Fixierungs- und Färbungsmethode zu entwickeln, welche es gestattet, im cytologischen Präparat die Proplastiden in ihrer Form, Größe und Struktur getreu dem im Leben erarbeiteten Bilde zu erhalten und darzustellen. Dabei mußte ein ganz besonderer Wert auf die Erhaltung der primären Granascheibchen gelegt werden, ihre Färbbarkeit genau studiert werden, und gleichzeitig war es im Hinblick auf die Chondriosomentheorie wichtig, die Chondriosomen mit derselben Fixier- und Färbetechnik in möglichst unveränderter Form zu konservieren. Die Verfechter der Chondriosomentheorie, welche mit den „méthodes mitochondriales“ gearbeitet haben, geben in ihren Schilderungen niemals an, daß außer den Stärkeeinschlüssen in den Proplastiden noch besonders färbbare Gebilde existieren, wie ich sie nach der Vitalfärbung mit Rhodamin B im vorigen Abschnitt geschildert habe. Es war also anzunehmen, daß diese Chondriosomen-Fixiermethodik zur Erhaltung der spezifischen Proplastidenstruktur nicht immer geeignet ist. In der Tat hat die experimentelle Nachprüfung dieser Frage eine Bestätigung dieser Vermutung gegeben (vgl. S. 153).

Die in der Karyologie gebräuchlichen Fixierungsmittel sind zur Konservierung der Proplastiden sicher gänzlich ungeeignet. Wenn sie geeignet wären, so hätte die botanische Wissenschaft bereits ein breiteres Material über die Struktur und Form der Proplastiden sowie über die Entwicklungsgeschichte der Plastiden erarbeitet. Man sucht in solchen Präparaten meist vergeblich nach den Plastidenanlagen, und wenn sie auffindbar sind, so sind sie weitgehend deformiert und zerstört. Die Chondriosomentechnik mit Formalin-Chrom-Osmium- und Essigsäure-Gemischen verschiedener Zusammensetzung scheint zwar die Form des Proplastidenstromas zu erhalten, aber die primären Grana sind meist zerstört. Sie sind auch von keinem Autor mit solchen Methoden beschrieben worden.

Für den Fortgang der Erforschung der Entwicklungsgeschichte der Plastiden war es daher zunächst am wichtigsten, für die Proplastiden in jungen Blättern, welche noch nicht ergrünt sind, ein brauchbares Fixier-, Einbettungs- und Färbeverfahren zu suchen, welches geeignet ist, reelle Bilder von der Form und Struktur der Plastidenanlagen zu liefern.

Erfahrungsgemäß ist von allen bekannten Fixierungsmitteln das Osmiumtetroxyd („Osmiumsäure“, OsO_4) das beste. Es erhält das Cytoplasma infolge seiner gelatinierenden Wirkung am getreuesten. Auch der mikroskopische Aspekt des Cytoplasmas bleibt fast unverändert. Eine mikroskopisch nachweisbare Kern- und Cytoplasmastrukturänderung ist nach OsO_4 -Fixation nicht leicht zu beobachten. Neben diesen Vorteilen

ergeben sich aber auch Nachteile. Schwarze OsO_2 -Imprägnationen treten infolge von Reduktionserscheinungen auf. Krümelniederschläge in Zellsafträumen können so entstehen. Die Färbbarkeit fixierter Strukturen leidet, wenn nicht durch Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd eine Beseitigung des Osmiumdioxids vorgenommen wird. Aus diesem Grunde wird in der Fixationstechnik die reine Osmiumsäure ungern verwendet und meist als Zusatz zu Fixiergemischen herangezogen.

Vom Standpunkt der bisherigen cytologischen Erfahrungen war zu vermuten, daß die reine Osmiumsäure in erster Linie geeignet erschien, die Proplastiden möglichst naturgetreu zu konservieren. Die Nachteile müssen dagegen in Kauf genommen werden. Reine Osmiumsäure wurde schon von A. Meyer (1883) und von Heitz (1937) zur Fixation der Chloroplasten-

grana empfohlen, so daß es wahrscheinlich war, daß auch die primären Grana der Proplastiden durch dieses Mittel konservierend fixiert werden können.

Flächenschnitte von der Blattunterseite wurden vom noch nicht ergrünten Basalteil eines jungen Blattes angefertigt und in einer 2%igen Lösung von Osmiumsäure kurz infiltriert und 20 bis 30 Minuten zur Fixation in der Osmiumsäure belassen. Hierauf werden die Schnitte in Aqua dest. 10 Minuten ausgewaschen, in einer Rhodamin-B-Lösung 1:1000

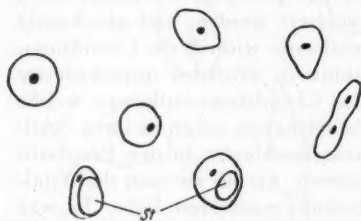


Abb. 12. Proplastiden aus dem nicht ergrünten Basalteil eines mittleren Blattes. Fixation mit 2%igem Osmiumtetroxyd. Nachträgliche Färbung mit Rhodamin B. *St*: Stärkekörner.

(Aqua dest.) 20 Minuten lang eingefärbt und im grünen Licht unter Verwendung bester Objektivoptik mikroskopisch untersucht.

Das Resultat dieser Untersuchungen war völlig einheitlich und zeigte, daß mit Hilfe der Osmiumsäure eine weitgehend naturgetreue Fixation der Proplastiden möglich ist. Die Form der Proplastiden stimmt nach dieser Fixation mit den in vivo festgestellten Formen völlig überein. Das Stroma ist so gut erhalten, daß selbst pseudopodienähnliche Fortsätze des Stromas wie in vivo beobachtbar sind. Das Stroma erscheint fast homogen. Man hat den Eindruck, daß eine an der Grenze der mikroskopischen Sichtbarkeit liegende feine Granulationsstruktur gleichmäßig das Stroma erfüllt. In jedem Proplastid ist regelmäßig ein mit Rhodamin B elektiv gefärbtes, rundes Scheibchen eingelagert, welches völlig dem im vital-gefärbten Präparat feststellbaren primären Granum entspricht. Es ist je nach dem Objekt in der Flächen- oder Seitenansicht zu sehen. Die Einzahl des primären Granums ist die Regel. Auch trifft man im Schnitt Zellen an, in deren Proplastiden häufig zwei Grana nachweisbar sind. Die beiden Scheibchen liegen dann entweder in geringer Distanz parallel oder etwas weiter voneinander entfernt polar. Im Zusammenhang mit dieser polaren Lage sind hantelförmige Einschnürungen häufig. Abb. 12 gibt eine Auswahl von Zeichnungen solcher Proplastiden wieder.

Die Chondriosomen werden durch die Osmiumsäurefixation völlig unverändert erhalten. Da das Cytoplasma durch die Osmiumsäure homogen gelatinisiert ist, sind die Chondriosomen trotz der sehr schwachen Färbung mit Rhodamin B deutlich im Plasmawandbelag sichtbar. Sie sind im Gegensatz zu den Proplastiden völlig strukturlos und besitzen niemals ein Granum.

Die Prüfung der Alkoholreihe und der Xylolbehandlung

Es war zunächst notwendig, zu prüfen, ob die mit OsO_4 fixierten Proplastiden die Behandlung mit der üblichen Alkoholreihe und eine nachfolgende Durchtränkung mit Xylol morphologisch unverändert überstehen können. Mit Hilfe der Rhodamin-B-Färbung konnte im Vergleich mit den beobachteten Vitalfärbungsbildern ein Urteil gewonnen werden.

Flächenschnitte von der Blattunterseite eines jungen, bleichen Basal-Blattschnittes wurden 1 Stunde lang in 2%iger Osmiumsäure nach Infiltration fixiert. Dann erfolgte eine zweistündige Wässerung in Aqua dest. Nach dieser Behandlung gelangten die Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe (40%, 60%, 80%, 96%). In jeder Stufe verweilten die Schnitte 15 Minuten. Dann wurden die Schnitte auf 2 Stunden in absoluten Alkohol überführt. Nach dem Aufenthalt in absolutem Alkohol erfolgte wieder eine Rückführung der Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe (je 15 Minuten in jeder Stufe) in destilliertes Wasser. Anschließend wurden die Schnitte $\frac{1}{2}$ Stunde lang in einer wäßrigen Lösung von Rhodamin B 1:1000 eingefärbt. Die im grünen Licht vorgenommene mikroskopische Analyse ergab, daß sowohl die Form des Plastidenstromas als auch das primäre Granum durch die Alkoholbehandlung nicht verändert wurden. Die Färbbarkeit des primären Granums mit dem lipophilen Farbstoff Rhodamin B erschien nicht beeinträchtigt.

Zur Prüfung der Xylolwirkung wurden die fixierten und gewässerten Schnitte in der oben beschriebenen Weise durch die aufsteigende Alkoholreihe in absoluten Alkohol überführt und dann auf 3 Stunden in Xylol gelegt. Nach der Xylolbehandlung wurden die Schnitte wieder über absoluten Alkohol die Alkoholreihe abwärts in destilliertes Wasser geführt (Aufenthalt 10 Minuten in jeder Stufe). Dann wurde wieder in Rhodamin-B-Lösung 1:1000 $\frac{1}{2}$ Stunde lang eingefärbt und mikroskopisch untersucht.

Es zeigte sich, daß die Proplastiden auch gegenüber der Xylolbehandlung resistent sind. Das Stroma und das primäre Granum sind unverändert färbbar und wie in vivo völlig naturgetreu erhalten.

Die Prüfung verschiedener Farbstoffe

Für eine Färbung von Dauerpräparaten ist das Rhodamin B nicht geeignet, da es die primären Granascheibchen nur auf Grund seiner Lipophilie färbt. Es ist wenig resistent gegen eine Auswaschung in der Alkoholreihe und gibt daher in Kanadabalsampräparaten im günstigsten Falle nur sehr schwach gefärbte Bilder. Es war daher notwendig, einen Farbstoff zu finden, welcher die primären Grana auf elektroadsorptivem Wege elektiv anzufärben vermag. Eine schwächere Färbung sollte sich auch auf das

Stroma gleichzeitig erstrecken. Eine Überführung derartig gefärbter Präparate in Kanadabalsam erschien aussichtsreich.

Die Auffindung geeigneter Farbstoffe für die Darstellung von Proplastiden mußte auf empirischem Wege geschehen, da keine Erfahrungen irgendwelche Anhaltspunkte geben konnten. Der Untersuchungsgang war folgender: Flächenschnitte von der bleichen Basalzzone eines jungen Blattes wurden in 2%iger Osmiumsäure infiltriert und 1 Stunde lang fixiert. Dann erfolgte eine ½stündige Wässerung in Aqua dest. Die so vorbehandelten Schnitte wurden in der zu prüfenden wäßrigen Farbstofflösung $\frac{1}{4}$ bis 1 Stunde lang eingefärbt. Die Farbstoffe wurden im Verhältnis 1:1000 in Aqua dest. frisch angesetzt. Nach der Färbung erfolgte eine Auswaschung in Aqua dest., so daß der nicht gebundene Farbstoff wieder entfernt wurde. Die erste mikroskopische Prüfung wurde in Wasser vorgenommen und vermerkt. Dann wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt (jede Stufe 2 bis 3 Minuten). Vom absoluten Alkohol wurden sie in Xylol und Kanadabalsam gebracht. Die zweite mikroskopische Prüfung erfolgte im Kanadabalsampräparat.

Dieses von mir eingeschlagene Verfahren war sicher sehr generell. Bei der großen Anzahl der geprüften Farbstoffe konnte jedoch erwartet werden, daß ein brauchbares Färbeverfahren gefunden werden konnte. Von 50 untersuchten gebräuchlichen Farbstoffen wurden folgende für eine elektive Färbung der primären Grana, des Proplastidenstromas und der Chondriosomen als brauchbar erkannt: Säurefuchsin, Rosanilin stand. Viktoriablau, Fuchsin, Pyronin, Rosanilinsulfat, Safranin, Janusgrün, Phenosafranin, Thionin, Methylenblau, Safranin T, Gentianaviolett, Neutralrot, Kernechtrot, Acridinorange, Chrysoidin, Acridinrot, Malachitgrün, Nilblausulfat, Rhodamin B und Rhodamin 6 G.

Die Entwicklung einer Technik zur Darstellung der Proplastiden in Mikrotomserien

Für eine entwicklungsgeschichtlich orientierte Cytologie der Plastiden ist eine brauchbare Fixiertechnik jedes beliebigen pflanzlichen Objektes eine der wichtigsten Grundlagen. Die vitale Untersuchung ist schwierig und sehr zeitraubend. Sie kann nur zur prinzipiellen Sicherung der Fixierungsergebnisse herangezogen werden, wird aber ihrer Natur nach nicht die brauchbare allgemeine Methodik für umfassende Studien darstellen.

Alle Fixationen wurden mit einer reinen, frisch hergestellten 2%igen Osmiumsäure durchgeführt. Bei der Fixiertechnik sind folgende Punkte als wichtig erkannt worden:

1. Die zu fixierenden Gewebestücke oder Organteile sollen relativ klein sein. Breite Blattstreifen von *Agapanthus* lassen sich in Osmiumsäure nicht in allen Teilen einwandfrei fixieren, da die Osmiumsäure viel zu langsam eindringt. In jungen embryonalen Geweben ist diese Maßnahme besonders wichtig, da hier das Interzellularsystem weniger entwickelt ist. Bei Blättern haben sich ganz schmale, etwa 1 mm breite, mit dem scharfen Rasier-

messer hergestellte Blattstreifen bewährt. Ganze Organe geben kein brauchbares Resultat.

2. Eine rasche Infiltration der zu fixierenden Gewebestücke mit Hilfe des Vakuum-Infiltrationsverfahrens in der Osmiumsäure ist dringend notwendig.

3. *Agapanthus* hat viel Wundschleim. Dieser erschwert die Fixation. Daher muß relativ wenig Gewebe in der Osmiumsäure fixiert werden, sonst stört der Schleim. Vorheriges Auswaschen der Streifen in Wasser ist günstig.

4. Die Dauer der Fixation betrug im Minimum 1 bis 2 Stunden. Auch längere Fixierzeiten haben sich bewährt, doch ist bei der raschen Wirkung der Osmiumsäure eine möglichst kurze Fixierzeit anzustreben. Man kann an der Verfärbung der Gewebestücke in der Osmiumsäure den Gang der Durchfixierung verfolgen. Je kürzer die Fixierzeit, um so weniger OsO_2 -Niederschläge entstehen im Präparat. Diese können nicht beseitigt werden, ohne die Proplastiden entscheidend zu verändern.

Die Beobachtung dieser Gesichtspunkte ergab schließlich brauchbare Fixierungsergebnisse. Das Rezept für die Fixierung junger *Agapanthus*-Blätter, welches für die vorliegende Arbeit als brauchbar erkannt wurde, war demnach folgendes:

Die zu untersuchende Blattregion wurde in der Querrichtung in etwa 1 bis 2 mm breite Streifen mit einem scharfen Rasiermesser zerlegt. Dann wurde der austretende Schleim im Schälchen in Leitungswasser ausgewaschen. In frisch hergestellter 2%iger Osmiumsäure erfolgte dann im Rezipienten eine möglichst intensive Infiltration. Hierauf wurden die Blattstreifen 1 bis 2 Stunden im Dunkeln in der Osmiumsäurelösung belassen. Dann folgte eine 12stündige Wässerung in fließendem Leitungswasser.

Die Einbettung in Paraffin und das Schneiden

Da Alkohol und Xylol die Proplastiden nicht zu verändern vermögen, war lediglich die in erhöhter Temperatur vorzunehmende Einbettung in Paraffin zu überprüfen. Diesbezügliche Vorversuche haben ergeben, daß eine Temperaturerhöhung auf 60° C auch durch 8 Tage von den Proplastiden unverändert ertragen werden kann. Daher wurde der normale Weg der Paraffineinbettung eingeschlagen, wobei auf eine möglichst geringe Temperaturbeanspruchung des Materials Wert gelegt wurde. Der Schmelzpunkt des Paraffins lag bei 52 bis 53° C. Die Thermostatttemperatur überschritt niemals 60° C.

Beim Schneiden müssen folgende Punkte beachtet werden. Die Schnittdicke soll 10 μ nicht überschreiten. Die Schnitttrichtung ist für die spätere Beobachtung der Proplastiden nicht gleichgültig. Schon die Lebendbeobachtungen an jungen Blattzellen haben gezeigt, daß die Proplastiden meist in der Nähe des Zellkernes oft recht dicht gedrängt beisammenliegen. Dabei breiten sie sich im Plasmawandbelag der Flächenmembranen aus und belegen die Seitenwände der Zellen seltener oder nur vereinzelt. Würde man Mikrotomserien untersuchen, welche Blattquerschnitte enthalten, so

hätte man eine geringe Chance, Proplastiden neben Chondriosomen in der Fläche des kernnahen Plasmawandbelages zu finden. Untersucht man dagegen Mikrotomserien, welche genau geführte Blattflächenschnitte enthalten, so ist in vielen Zellen des Flächenschnittes eine Flächenmembran (Perikline) zu beobachten, in deren mittlerem, kernnahem Bereich die Proplastiden in charakteristischen Gruppen im peripheren Plasmawandbelag liegen, so daß sie gut auffindbar und analysierbar sind.

Die Färbung der Mikrotomserien

Nach dem Entparaffinieren der aufgeklebten Schnitte in Xylol wurden die Objektträger durch die Alkoholreihe (abs. Alk., 96%, 90%, 80%, 60% und 40%iger Alkohol) in Aqua dest. überführt, wobei sie in jeder Konzentrationsstufe 2 bis 3 Min. verblieben. Dann wurde gefärbt. Alle Farben, mit denen Färbeversuche gemacht wurden, ließen sich gut in Aqua dest. lösen, außer Rosanilin, das sowohl bei einer Konzentration von 1:100 als auch 1:1000 einen unlöslichen Rest hinterließ, der abfiltriert wurde. Nach Vorversuchen mit Farblösungen im Verhältnis 1:1000, die aber lange Färbezeiten benötigten, wurde dann nur noch mit Lösungen im Verhältnis 1:100 eingefärbt. Auf Grund der in den Vorversuchen gewonnenen Erfahrungen wurde mit folgenden Farbstoffen eingefärbt:

Rosanilin	9—10 Stunden
Viktoriablau	9—10 „
Fuchsin	$\frac{1}{2}$ —1 „
Safranin	4—5 „

Nach der Färbung wurde der Objektträger kurz in Aqua dest. gespült und dann durch die Alkoholreihe wieder hochgeführt. Es hängt von der angewandten Farbe ab, wie lange die gefärbten Schnitte in der Alkoholreihe bleiben können. Rosanilin und Viktoriablau werden leider dabei stark ausgewaschen, so daß man sehr schnell arbeiten muß. Dagegen färben Fuchsin und Safranin kräftiger und dauerhafter, so daß sich mit einiger Übung in der Alkoholreihe die gewünschte Färbung herausdifferenzieren läßt. Dann erfolgte die Überführung in Kanadabalsam.

Wenn auch die oben dargestellten Färbemittel zu recht brauchbaren Präparaten führten, so habe ich im Laufe der jahrelangen Durchführung dieser Untersuchungen immer wieder nach besseren Färbemethoden gesucht. In der Säurefuchsinfärbung nach Altmann (vgl. Romeis 1948) konnte ich schließlich das für die Darstellung der Proplastiden und Chondriosomen beste Färbeverfahren finden. Die Altmannsche Färbemethode bietet für die mikroskopische Auswertung der Präparate folgende große Vorteile: Die Zellmembranen verbleiben ungefärbt und stören nicht mehr die Beobachtung. Das Cytoplasma ist sehr schwach gefärbt und tritt nicht störend in Erscheinung. Die Zellkerne zeigen im Gerüst nur eine sehr schwache Färbung, so daß auf dem Kern liegende Proplastiden noch analysiert werden können. Nur die Nukleolen zeigen eine elektive dunkelrote Färbung. Die Proplastiden sind so scharf herausgefärbt, daß alle Einzelheiten leicht und sicher beurteilt werden können. Das Stroma der Pro-

plastiden ist schwach rot und gleichmäßig tingiert. Das primäre Granum speichert ähnlich wie die Nukleolen des Kernes das Säurefuchsin so stark und elektiv, daß es trotz seiner Kleinheit leicht und sicher in jedem Proplastid aufgefunden werden kann. Es heben sich in diesen Präparaten als stark gefärbte Struktureinheiten nur die Nukleolen und primären Granascheibchen hervor. Die Chondriosomen sind schwächer tingiert, aber in aller Deutlichkeit studierbar.

Besonders in schwierigen Fällen, wenn die Proplastiden viel Stärke enthalten, konnte nur mit Hilfe der Säurefuchsinfärbung Klarheit geschaffen werden. Die Stärkekörner sind dann leicht rosarot gefärbt, und die primären Granascheibchen können auch dann noch festgestellt werden, was mit den anderen angewandten Farbstoffen infolge einer zu starken Färbung des Stromas nicht möglich war.

Die Auswertung der Mikrotomschnitte

Auf Grund der Erfahrungen, welche am lebenden Material gewonnen wurden, war es zu erwarten, daß in jüngsten Blattgeweben die cytomorphologische Analyse der Proplastiden den größten Schwierigkeiten begegnen wird, weil die Stärkeeinschlüsse störend wirken müssen und häufig die primären Grana verdecken können.

Der proplastidische Charakter der Plastiden bleibt aber im wachsenden Blatt recht lange erhalten. Selbst in den blaßgrünen Basalzonen wachsender junger Blätter liegen noch schwach ergrünende Proplastiden vor. Erst in der Zone stärkerer Ergrünung entwickeln sich die Proplastiden zu Chloroplasten. In Abb. 13 ist ein im vollen Wachstum befindliches Knospenblatt von *Agapanthus umbellatus* von etwa 12 cm Länge schematisch dargestellt. Die basale Zone *a* enthält Proplastiden, welche sehr viel Stärke enthalten. (Dies gilt für gut ernährtes Sommermaterial, im Winter ist der Stärkegehalt der Proplastiden stark reduziert, was für cytologische Arbeiten recht günstig ist.) Dieses Stadium der Proplastiden soll als amyloplastisches Proplastidenstadium gekennzeichnet werden. In der Zone *b* ist die Stärke schon meist weitgehend abgebaut, aber in vielen Fällen noch nachweisbar. Zone *c* ist immer völlig stärkefrei. Hier liegen typische, noch nicht ergrünte, stark herangewachsene Proplastiden vor. Sie seien als stärkefreies Entwicklungsstadium der Proplastiden gekennzeichnet. In Zone *d* beginnt die Pigmentbildung. Die Form und Struktur der Proplastiden ist noch nicht verändert; im Granum tritt die Pigmentbildung in Erscheinung. In Zone *e* und *f* verlieren die Proplastiden ihren proplastidischen Charakter; sie werden allmählich zu typischen Chloroplasten unter gleichzeitigem starken Ergrünen. Die dunklen Teile des Blattes besitzen fertige Chloroplasten, deren Entwicklung abgeschlossen ist. Es ist zweckmäßig, die Begriffe Proplastid und Chloroplast cytologisch abzugrenzen.

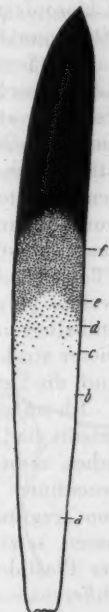


Abb. 13.
Die Zonierung
eines mittleren
Agapanthus-
Blattes. Nähe-
res im Text.

Man könnte im einfachsten Falle dann von Proplastiden sprechen, wenn eine Pigmentbildung nicht beobachtbar ist. Dann wäre lediglich die Pigmentierung, nicht aber die cytologische Struktur für eine Abgrenzung der beiden Typen ausschlaggebend. Die Zonen *a*, *b*, *c* würden dann allein Proplastiden enthalten. Zone *d* enthält schon nach einer solchen Definition Chloroplasten. Diese dem Wortsinne gemäße Definition ist aber vom Standpunkt der Cytomorphologie der Plastiden nicht zweckmäßig.

Das fertig entwickelte Chlorophyllkorn ist vor allem polygranulär. Die Grana, welche allein die Pigmente enthalten, sind in geldrollenförmigen Säulchen angeordnet (Strugger 1950, 1951). Das Stroma ist wahrscheinlich lamellär gebaut, was nach Frey-Wyssling und Mühlethaler (1949) auch für das Einzelgranum zutrifft. Durch diesen höchst komplizierten Schichtenbau ist das Chlorophyllkorn ein bestimmt geformtes Gebilde von konstanter Gestalt und Größe. Die Scheiben- oder Linsenform ist eine charakteristische morphologische Eigenart der Chloroplasten der höheren Pflanzen. Als Chloroplasten sollen daher Plastiden bezeichnet werden, welche polygranulär und lamellär gebaut sind, in den Grana Pigmente enthalten und meist durch eine konstante Gestalt ausgezeichnet sind. Aus dieser strukturellen Definition des Begriffes „Chloroplast“ ergibt sich jetzt auch die Definition des Begriffes „Proplastid“.

Ich schlage vor, alle Plastiden in jungen Geweben, welche monogranulär gebaut sind, keine festgelegte Gestalt besitzen und ein amöboid veränderliches, nicht lamelliertes Stromaplasma aufweisen, als „Proplastiden“ zu bezeichnen. Tritt im Granum Chlorophyll in Erscheinung, so spricht man von „ergrünenden Proplastiden“. Erst wenn mehr als zwei Grana auftreten, setzt die Metamorphose zum Chloroplasten ein. Die Reihenfolge der Plastidenentwicklung im *Agapanthus*blatt ist dann mit zunehmender Differenzierung des Blattgewebes folgende:

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| 1. amyloplastische Proplastiden | } monogranulär |
| 2. stärkefreie Proplastiden | |
| 3. ergrünende Proplastiden | |
| 4. Jungchloroplasten | } polygranulär |
| 5. fertige Chloroplasten | |

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hinsichtlich der Methodik und der Strukturanalyse nur mit den ersten drei Stadien. Die Metamorphose des monogranulären Proplastids zum fertigen Chloroplasten soll der Gegenstand weiterer geplanter Untersuchungen werden.

Den Ausgangspunkt der Darstellung bilden zunächst die stärkefreien Proplastiden (Abb. 13, Zone *c*). Die amyloplastischen und ergrünenden Proplastiden wurden im Anschluß an die stärkefreien Proplastiden analysiert.

1. Die stärkefreien Proplastiden der noch nicht pigmentierten Streckungszone nächst der Ergrünungszone des jungen Blattes

10 bis 20 cm lange Blätter, welche frisch geerntet waren, wurden für die Fixation vorbereitet, indem aus der Streckungszone des Blattes, dort, wo

die weiße Färbung in ein kaum erkennbares Gelb-Grün übergeht, Streifen fixiert wurden (Abb. 13 zwischen *c* und *d*). Nach der Einbettung und Färbung der erhaltenen Mikrotomserien wurden die Proplastiden und Chondriosomen studiert.

Die Epidermis ist bereits fertig differenziert. Die Zellen sind schon in die Länge gestreckt und die Stomata voll entwickelt. Die Mesophyllzellen sind abgerundet, etwas in die Länge gestreckt und die Interzellularen schon deutlich ausgebildet. Die Prokambiumstränge sind schon so weit differenziert, daß 1 bis 2 Schraubengefäße nachweisbar sind. Sonst sind noch viele nicht differenzierte Gefäße mit Querwänden und Kernen zu beobachten. Die cytomorphologische Organisation der Mesophyllzellen in dieser Zone ist in Abb. 14 übersichtlich dargestellt. Der Zellkern ist homogen granu-

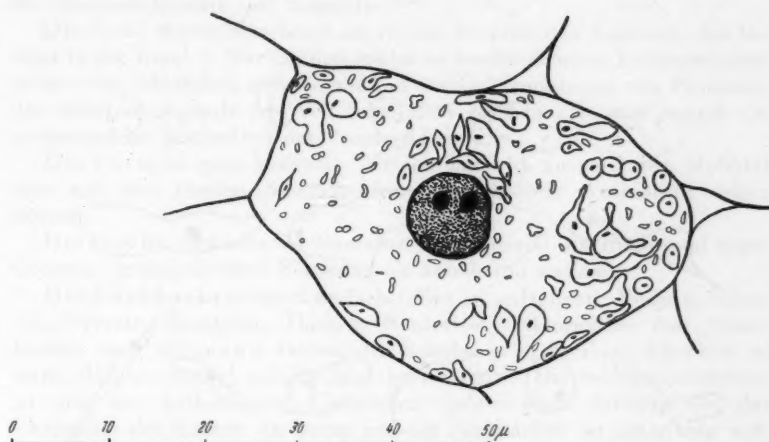


Abb. 14. Junge Mesophyllzelle aus der Streckungszone eines 10 bis 20 cm langen Blattes (Mikrotomschnitt). Außer dem Zellkern sind die Proplastiden und Chondriosomen eingezeichnet.

liert, sehr gut fixiert und hat einen durchschnittlichen Durchmesser von $8\ \mu$. Der Zelldurchmesser in der Längsrichtung beträgt $46\ \mu$, in der Querrichtung 20 bis $50\ \mu$. Das Cytoplasma bildet einen völlig homogen fixierten, nicht sonderlich gefärbten Wandbelag, der um den Kern dichter ist. In diesem Wandbelag ist eine oft mosaikartige Anordnung der Proplastiden zu sehen, welche häufig um den Kern dichter gelagert sind. Neben den Proplastiden liegen die kleineren Chondriosomen, welche im Cytoplasma überall verteilt sind. Die Fixation ist so reell, daß die in vivo beobachtbare Verteilung und Form der einzelnen Zellelemente völlig naturgetreu erhalten geblieben ist.

Dieses Bild ist in variiert Weise grundsätzlich in allen Mesophyllzellen anzutreffen. Die Proplastiden sind mit bester Immersionsoptik in

diesen Präparaten ungemein klar zu beobachten. Abb. 15 gibt einen Überblick der beobachteten Formen. Da in der Literatur Größenangaben für Proplastiden in jungen Blattanlagen fehlen, habe ich eine große Anzahl von Proplastiden vermessen. Infolge der Amöboidie des Stromas schwanken die Werte für die größte Länge und größte Breite der Proplastiden beträchtlich. Sie liegen für die größte Länge zwischen $1,7\ \mu$ und $7,2\ \mu$, für die größte Breite zwischen $0,7\ \mu$ und $3,2\ \mu$. Viel konstanter ist dagegen die Größe des primären Granums. Diese schwankt zwischen $0,3$ und $0,7\ \mu$, hält sich aber in der Mehrzahl der Fälle um einen Mittelwert von $0,4$ bis $0,5\ \mu$.

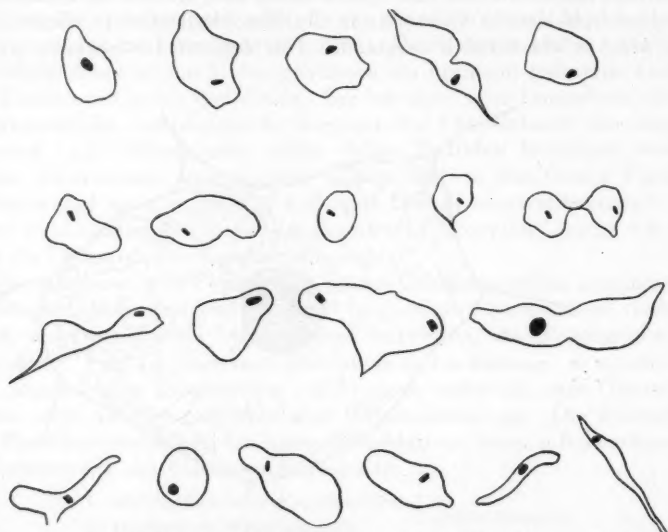


Abb. 15. Herausgezeichnete Proplastiden aus der Streckungszone (nicht ergrünt) eines jungen Blattes.

Die Tafel, Fig. 1—4, gibt einige Mikrophotographien wieder. Das Stroma ist völlig homogen. Manchmal ist eine an der Grenze mikroskopischer Auflösbarkeit gelegene Fixationsgranulation vorhanden, welche an schlechter fixiertem Material deutlicher zu sehen ist. Es nimmt stärker als das Cytoplasma die gebotenen Farben (Fuchsin, Säurefuchsin, Rosanilin st., Thionin und Victoriablau 4R) an, so daß sich der Stromaleib der Proplastiden blaß gefärbt klar vom Cytoplasma abhebt, welches kaum gefärbt ist. Stärkekörner waren in dieser Zone in den Proplastiden nicht mehr enthalten.

Die Umrißformen der Proplastiden gleichen völlig den Bildern, welche ich in den Schnitten am lebenden Material festlegen konnte. Von einer festen Gestalt der Proplastiden kann nicht gesprochen werden. Entsprechend der intra vitam festgelegten Amöboidie liefern die fixierten Präparate augenblicklich erstarrte Umrißformen der Proplastiden, welche sehr mannigfaltig sind. Runde, ovale oder bucklige Formen nach Art der

Kartoffelstärkekörner sind recht häufig. Spindel- und Fadenformen herrschen ebenfalls vor. Pseudopodienähnliche Fortsätze treten immer wieder in Erscheinung. Fein ausgezogene Spitzenenden sind oft charakteristisch.

Sehr eindrucksvoll ist aber in diesen Präparaten das regelmäßige Auftreten eines völlig neuen Bauelementes der Proplastiden, welches durch die bisherigen Beobachter übersehen wurde, da es mit den üblichen Fixiermethoden leicht zerstört wird. In jedem Proplastid ist ein stark färbbares Gebilde zu erkennen, welches eine ganz konstante, charakteristische Gestalt besitzt. Entweder ist es rund oder es erscheint stäbchenförmig. Die mikroskopische Analyse lehrte, daß es sich um einen scheibchenförmigen Körper handelt, der entweder die rund begrenzte Scheibenfläche oder die Kante dem Beobachter zukehrt. Beide Ansichten sind häufig zu sehen (vgl. Tafel 1, Fig. 2). Die auffallendsten Kennzeichen dieser ganz regelmäßig auftretenden Strukturelemente sind folgende:

Die Zahl dieser Scheibchen ist in den Proplastiden konstant. Sie beträgt in der Regel 1. Nur bei den später zu beschreibenden Teilungsstadien treten zwei Scheibchen auf. Gebilde in der Größenordnung von Proplastiden habe ich niemals frei von Scheibchen gesehen. Sie sind sonach ein integrierender Bestandteil der Proplastiden.

Die Form ist ganz konstant. Niemals habe ich an normalem Material eine von der runden Scheibchenform abweichende Ausbildung sehen können.

Die Größe schwankt bei normalem Blattmaterial innerhalb recht enger Grenzen. Innerhalb eines Blattes ist sie annähernd konstant.

Die Färbbarkeit mit Kernfarbstoffen ist auffallend. Fuchsin, Safranin, Pyronin, Rosanilin, Thionin, Neutralrot, Viktoriablauf und Säurefuchsin nach Altmann färben die Scheibchen trotz ihrer Kleinheit so stark, daß sie dunkel gefärbt klar hervortreten. Die Scheibchensubstanz ist also mit kathodischen Farbstoffen ebenso stark färbbar wie das Chromatin des Kernes. In bezug auf die Färbbarkeit ist sonst kein weiteres Zellelement mit diesen Scheibchen zu vergleichen. Nicht nur kathodische Farbstoffe werden auf der Basis der elektroadsorptiven Bindung ähnlich wie im Chromatin des Zellkernes bevorzugt adsorbiert, sondern abweichend vom Verhalten des Zellkernes werden auch lipophile, elektro-neutrale Farbstoffe elektiv durch die Scheibchen gespeichert. Mit Rhodamin B gelingt eine elektive Darstellung dieser Struktur in wäßriger Lösung, und auch das lipophile Janusgrün gibt positive Resultate.

Die Teilungsfähigkeit ist durch Beobachtung klar belegt. Teilt sich ein Proplastid, so teilt sich zuerst das Scheibchen parallel zur Fläche. Schon die Tatsache, daß jedes Proplastid ein Scheibchen besitzt, ist ein eindeutiger Beleg für das Teilungsvermögen und damit für die identische Reproduktion dieser Strukturelemente.

Sowohl nach der Vitalfärbung mit Rhodamin B als auch am osmium-säurefixierten Material sind also in jedem Proplastid diese Scheibchen nachweisbar. In vivo konnte an sehr gering ergrünem Material der fluoreszenz-optische Nachweis erbracht werden, daß das Chlorophyll in diesen Strukturelementen auftritt. Damit ist aber die Grana-Natur dieser Scheibchen

hinlänglich belegt. Sonach können sie als „primäre Grana“ bezeichnet werden.

Außer den Proplastiden sind im Cytoplasma noch kleinere Gebilde regelmäßig zu beobachten, welche sich von den Proplastiden nicht nur durch ihre geringere Dimensionierung, sondern auch durch ihre Form und ihre Homogenität deutlich unterscheiden. Abb. 16 ist ein naturgetreuer Ausschnitt aus dem Cytoplasmawandbelag einer Mesophyllzelle. Die Proplastiden bilden hier eine charakteristische Gruppe. Neben Proplastiden mit einem Granum sind auch bereits eingeschnürte Teilungsstadien mit zwei Grana zu sehen. Zwischen den Proplastiden liegen im Cytoplasma kleinere ovale oder stäbchenförmige Gebilde. Sie besitzen kein primäres Granum, erscheinen im Innern völlig strukturlos und sind schwächer gefärbt. Es handelt sich um die Chondriosomen,

welche man auch in vivo in derselben Größenordnung beobachten kann. Häufig sind diplosomenähnliche Bildungen oder eingeschnürte Stäbchen, gelegentlich streptokokkenähnliche Ketten zu sehen.

Es steht fest, daß die Proplastiden sich grundsätzlich in folgenden Punkten von den Chondriosomen unterscheiden:

1. Die Proplastiden sind größer als die Chondriosomen.

2. Die Gestalt der Proplastiden ist nicht festgelegt. Sie sind amöboid veränderlich und zeigen daher im fixierten Präparat denkbar wechselnde Umrißformen.

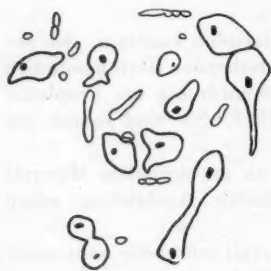
3. Die Proplastiden besitzen ein Stroma und ein primäres Granum. Das Stroma ist feinstkörnig fixiert und recht kompakt färbbar. Das Granum ist maximal mit Kernfarbstoffen färbbar.

Abb. 16. Ausschnitt aus dem Plasmawandbelag einer Mesophyllzelle. Noch nicht ergrünte Streckungszone. Die Proplastiden sind strukturell von den Chondriosomen eindeutig verschieden.

4. Im Gegensatz dazu sind die Chondriosomen kleinere Gebilde. Ihre Gestalt ist nicht so polymorph, sondern relativ konstant stäbchenförmig bis oval. Niemals führen sie ein stark färbbares Strukturelement, und ihr Leib ist nicht so fein durch das Fixiermittel granuliert, sondern mehr homogen. Auch nehmen sie die Farbe weniger an.

So ist auch mit Hilfe der Fixierung und Färbung eine deutliche Trennung der Proplastiden von den übrigen Strukturelementen im Plasma, insbesondere von den Chondriosomen festzustellen.

Von besonderem Interesse war die Auswertung der Mikrotomserien bei der Bearbeitung der Frage nach dem Teilungsmodus der Proplastiden. Die relativ große Zahl der Chloroplasten wird nach meinen Beobachtungen bei *Agapanthus* schon im Proplastidenstadium weitgehend erreicht. In den embryonalen Zellen der Blattanlagen sind zweifellos weniger Proplastiden enthalten als etwa in den Zellen der hier behandelten Streckungszone. Quantitative Untersuchungen zur Frage der Anzahl der Proplastiden und



fertigen Chloroplasten sollen in einer gesonderten Arbeit meines Institutes behandelt werden.

Die Vermehrung der Plastiden erfolgt auf zweierlei Weise.

1. Teilung der monogranulären Proplastiden in den meristematischen Zellen bis hinauf in die hier besprochenen Zellen der Streckungszone.

2. Fragmentation (einfache Durchschnürung) junger polygranulärer Chloroplasten in den älteren Blattentwicklungszonen.

Das Auftreten von Teilungsstadien in den Zellen der Streckungszone ließ sich in den Mikrotomserien nach eingehendem Studium hinreichend belegen.

Zunächst wurde die Frage geprüft, ob in den erstarrten Momentbildern fixierter Mesophyllzellen sich Teilungsstadien in jeder Zelle regelmäßig finden lassen oder ob in einzelnen Zellen das Teilungsgeschehen gehäuft in Erscheinung tritt.

Die meisten Zellen zeigen in den Präparaten nur monogranuläre Proplastiden. Vereinzelt Zellen dagegen fallen dadurch auf, daß sie viele bi-

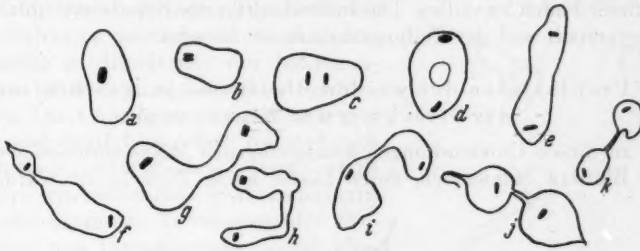


Abb. 17. Teilungsstadien der Proplastiden. Näheres im Text.

granuläre Proplastiden enthalten. Es besteht auf Grund dieser Beobachtungen kein Zweifel, daß das Teilungsgeschehen in den Zellen weitgehend synchronisiert ist und demnach in den Proplastiden einer Zelle wellenförmig abläuft und dazwischen teilungsfreie Perioden die Norm darstellen.

Das Teilungsgeschehen kann in den Mikrotomserien naturgemäß nur kombinatorisch aus vielen Einzelbefunden, welche allerdings in ihrem regelmäßigen Auftreten eine befriedigende Sicherheit für die Schlußfolgerungen gewähren, rekonstruiert werden. Als allererstes Anzeichen einer Teilung ist das Auftreten zweier getrennter Grana festzustellen. Abb. 17 b gibt ein solches Proplastid wieder. Zwei völlig parallel gelagerte Granascheibchen sind in identischer Ausbildung in das Stroma eingelagert. Die Bilder sind nur verständlich, wenn man eine identische Reproduktion der primären Granascheiben annimmt. Als Beleg für diese identische Reproduktion kann folgendes angeführt werden:

1. Es gibt Zellen, in denen die Granascheiben der Proplastiden in der Seitenansicht äußerst dünn erscheinen. Hier ist von einer Andeutung einer Reduplikation nichts zu erkennen.

2. Es gibt häufig Zellen, in denen die Granascheiben in Seitenansicht relativ dick erscheinen. Ein solcher Fall ist in Abb. 17 a dargestellt. Bei

Beobachtung mit den besten Apochromaten erscheinen dann die Granascheiben in der Seitenansicht nicht strichförmig, sondern schmal rechteckig. Da die Dimensionierung für das Lichtmikroskop zu gering ist, kann ich nur berichten, daß ich in diesen Fällen immer wieder den Eindruck hatte, daß zwei Granascheibchen auseinanderweichen (Abb. 17 b und c).

Die primären Granascheibchen erfahren sonach, ähnlich wie es bei den Chromonemata und Chromomeren der Fall ist, in der Scheibenebene eine identische Reproduktion. Ferner ist es durch unmittelbare Beobachtung gesichert, daß die Tochterscheibchen sich trennen und in paralleler Lagerung zunächst im Stroma auseinanderweichen (vgl. Abb. 17 c). Dieser Vorgang der weiteren Distanzierung der Tochtergrana läuft weiter, so daß die beiden Grana schließlich polar gelagert sind (Abb. 17 d). Dann streckt sich das Proplastidenstroma in die Länge und beginnt sich median einzuschnüren (Abb. 17 e). Die Einschnürung wird immer ausgeprägter, so daß sich zwei Proplastiden allmählich bilden, welche mit einer dicken, später fast fadenförmigen Brücke zusammenhängen (Abb. 17 f–k). Dann braucht nur mehr dieser Faden zu reißen. Die Individualität der Schwesterproplastiden wird hergestellt und der Teilungsvorgang ist beendet.

2. Die Proplastiden der weißen Blattbasis junger Blätter vor der Streckung und Ergrünung

Die zu diesen Untersuchungen herangezogenen Mikrotomserien wurden jungen Blättern entnommen, deren basale weiße Zone fixiert wurde. In

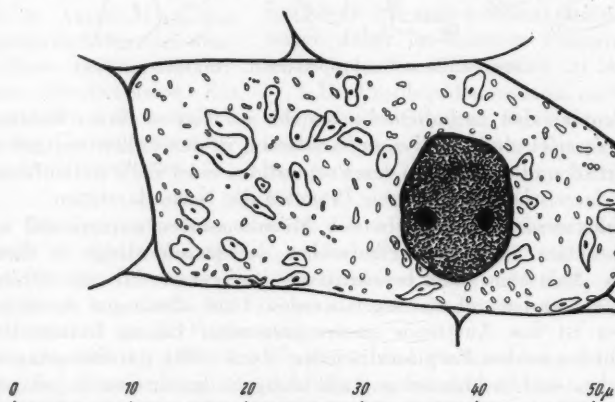


Abb. 18. Näheres im Text.

Abb. 15 entspricht die Zone ungefähr den Zonen c und b. Die anatomische Ausgestaltung der Gewebe ist in diesen Blattabschnitten dadurch charakterisiert, daß das Zellmaterial fertig gebildet ist. Teilungen sind selten anzutreffen. Die Zellen des Mesophylls sind noch nicht stark gestreckt und sind im Schnitt annähernd rechteckig. Interzellularen sind noch nicht sehr

stark entwickelt. Die Prokambiumstränge sind noch wenig differenziert. Lediglich Ringgefäße und einige Schraubengefäße sind ausgebildet oder in Bildung begriffen. Die Epidermiszellen sind ebenfalls wenig gestreckt, das Spaltöffnungsmuster ist fertig, die Stomata aber noch nicht endgültig differenziert.

Eine Übersichtszeichnung einer typischen Zelle soll zunächst besprochen werden (vgl. Abb. 18). Die Zellen des Mesophylls sind recht klein, 20 bis 50 μ lang. Der Kern ist in diesen Präparaten sehr gut durch die Osmiumsäure fixiert. Seine Chromomerenstruktur ist deutlich zu beobachten. Das Cytoplasma ist strukturlos fixiert (gelatiniert). Hier liegen deutlich, als Gebilde sui generis erkennbar, die Proplastiden im Cytoplasma eingebettet. Oft bilden sich um den Kern oder in einzelnen Arealen typische Gruppen. Ihre Form ist auch in diesen jungen Zellen amöboid wechselnd. Häufig herrschen ovale, kartoffelstärkekornförmige Stromaformen vor. Auch hier ist in jedem Proplastid ein stark färbbares primäres Granascheibchen regelmäßig in Hunderten von Mikrotomschnitten eindeutig zu beobachten und zu belegen. Die Chondriosomen sind sehr gut fixiert und deutlich zu sehen. Sie sind auch hier kleiner und enthalten niemals stark färbbare granaähnliche Strukturelemente. Die mikroskopische Vermessung der Proplastiden und Chondriosomen ergab ähnliche Größenverhältnisse, wie sie in früheren Abschnitten niedergelegt sind. Auch waren Teilungsstadien häufig zu beobachten.

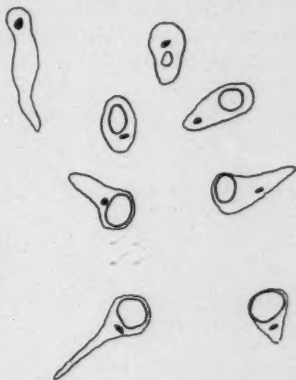


Abb. 19. Stärkeführende Proplastiden aus der Basalzone eines mittleren Blattes (Sommermaterial).

In bezug auf den Stärkegehalt der Proplastiden hat es sich gezeigt, daß in den basalen weißen Zonen junger Blätter der Stärkegehalt je nach der Jahreszeit, in welcher man das Material fixiert, schwankt. Im Wintermaterial hat diese Zone keine Stärke mehr. Im Sommermaterial dagegen sind die Proplastiden noch mit Stärke beladen. Abb. 19 zeigt solche Proplastiden aus Sommermaterial. Meist exzentrisch ist ein mehr oder weniger großes Stärkekorn im Stroma ausgebildet. Man kann aber deutlich feststellen, daß das gefärbte Stroma das Stärkekorn völlig umhüllt. An einer Seite ist ein Stromafortsatz entwickelt, in welchem ganz klar das primäre Granum eingelagert ist. Hier sind also die Proplastiden typische Amyloplasten.

Die Proplastiden in meristematischen Blättern von $\frac{1}{2}$ bis 4 cm Länge

Die Mesophyllzellen so kleiner Blätter sind postmeristematisch. Das Teilungswachstum ist noch im Gange. Die Prokambiumstränge sind weitgehend undifferenziert. Auch die Epidermis ist noch nicht fertig. Die Musterbildung beginnt soeben.

Das Material ist sehr schwer zu fixieren. Nur wenige Fixationsversuche von vielen führten zum Erfolg. War die Fixation schlecht, so konnten im schaumig degenerierten Plasma kaum klare Beobachtungen durchgeführt werden. War die Fixation gelungen, so konnten Proplastiden klar gesehen werden. Auch dann waren die Schwierigkeiten der Färbung und Beobachtung noch groß. Die umfangreichen, durch zwei Jahre fortgesetzten Bemühungen ergaben, daß bei gelungener Fixation die Altmannsche Säurefuchsinfärbung dann zur Klarheit über die cytologischen Verhältnisse führte, wenn mit Hilfe des Ortholux² von Leitz unter Anwendung von Fluoritoptik beobachtet wurde. Zur Farbkontrastierung eignete sich dabei der Vario-Kolor-Kondensor vorzüglich.

In so jungen Blattmesophyllzellen sind die Proplastiden sehr stark mit Stärke beladen. Sie haben dann die Funktion von Leukoplasten und speichern die Reserven für das weitere Zelldifferenzierungswachstum. Solche

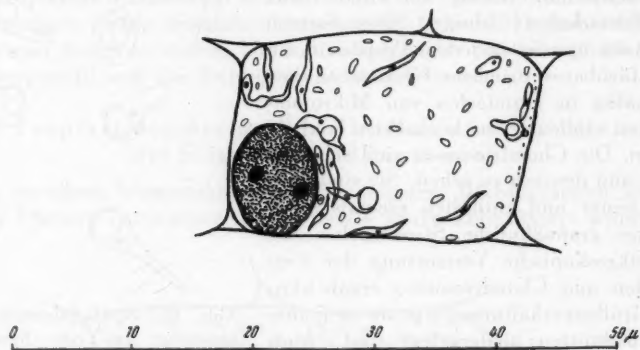


Abb. 20. Eine postmeristematische Mesophyllzelle aus einem $\frac{1}{2}$ cm langen Blatt.

Proplastiden werden daher zweckmäßig „amyloplastische Proplastiden“ genannt. Die Stärkeführung erschwert die cytologische Analyse sehr. Weil auch Vakuolen in Proplastiden vorkommen, mußte in jedem Präparat der Stärkenachweis durchgeführt werden, da im Kanadabalsam Vakuolen und Stärkekörner nicht ohne weiteres unterschieden werden können. Der Stärkenachweis gelang in jedem Falle mit Hilfe der Polarisationseinrichtung des Ortholux von Leitz recht leicht. Selbst bei kleinsten Stärkeeinschlüssen war das Sphäritenkreuz mit Hilfe der Ölimmersion zu sehen.

Um die cytologische Analyse der Schnittserien zu erleichtern, wurde zunächst das stärkearme oder gar stärkefreie Material als Grundlage bearbeitet. In Abb. 20 ist eine Mesophyllzelle in Totalansicht aus einer der besten Schnittserien herausgezeichnet. In diesem Wintermaterial liegen

² Ich bin der „Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen“ zu ganz besonderem Dank verpflichtet, daß ich durch eine Unterstützung in die Lage versetzt wurde, das Ortholux von Leitz mit bester Optik für diese Untersuchungen einzusetzen.

die Verhältnisse recht klar. Die Proplastiden sind entweder stärkefrei, oder sie führen kleine Stärkekörner, welche aber das Stroma nicht bis zur Unkenntlichkeit deformieren. Ihre Gestalt ist vornehmlich spindelförmig. Wenn ein Stärkekorn polar ausgebildet ist, so liegt dieses deutlich im Stroma und es resultiert eine Trommelschlägelform. In jedem Proplastid ist auch hier ein stark färbbares primäres Granum nachzuweisen.

Die Chondriosomen sind in diesen Zellen gegenüber den Proplastiden deutlich kleiner und besitzen kein primäres Granum. Auch führen sie niemals Stärke.

Die Analyse der Schnittserien vom stärkeführenden Sommermaterial stellte an die Optik die höchsten Anforderungen. Zwei Jahre lang wurden diese Schnittserien beobachtet, bis die Verantwortung übernommen werden konnte, diesen kleinen Abschnitt zu veröffentlichen. Im Hinblick auf die dürftigen bisherigen Kenntnisse jugendlicher Plastiden schien mir diese Mühe gerechtfertigt zu sein.

Die Fig. 5 und 6 der Tafel geben einen Eindruck vom Stärkereichtum dieser postmeristematischen Zellen des jüngsten Blattmesophylls. Selbstverständlich war von vornherein klar, daß das Proplastidenstroma stark gedehnt ist und oft als mikroskopisch kaum sichtbares Häutchen die relativ großen Stärkekörner umspannt. Ist nur ein Stärkekorn im Stroma entwickelt, so lagen die Verhältnisse noch relativ einfach. Meist aber sind 2 bis 5 Stärkekörner im Stroma entwickelt, so daß das Stromaplasma zwar das Stärkeaggregat umschließt, aber dann sehr schwer nachweisbar wird. Dazu kommt noch die wichtige Frage, ob diese jugendlichen Plastidenanlagen ein Granum führen.

Diese amyloplastischen Proplastiden liegen außerdem nur selten einzeln. Sie sind in der Regel systrophisch um den Zellkern zu Aggregaten geballt, was ihre cytologische Analyse weiterhin erschwert.

Zur Darstellung des Stromas hat sich eine intensive Färbung der Präparate mit Viktoriablau 4R sehr bewährt. Die um die Stärkekörner gespannte Stromahülle färbt sich blau und konnte in allen Fällen sicher gestellt werden. Die Stärkekörner färben sich metachromatisch in einem rötlichen Ton, so daß eine gute Differenzierung des Stromas erzielt wird. Die primären Grana sind an Präparaten, welche mit Viktoriablau gefärbt sind, gelegentlich als schwarzblaue Einschlüsse im Stroma zu sehen.

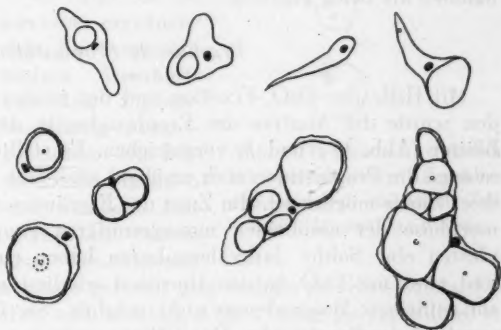


Abb. 21. Amyloplastische Proplastiden aus post-embryonalen Zellen des Mesophylls eines etwa $\frac{1}{4}$ cm langen Blattes (Sommermaterial).

Für die elektive Darstellung der primären Grana hat sich aber die Altmannsche Säurefuchsinfärbung am besten bewährt. Die dunkelrot gefärbten Grana schimmern dann auch bei ungünstiger Lagerung noch immer deutlich durch. Wird schließlich noch im Polarisationsmikroskop ergänzend untersucht, so ist es möglich, über die Struktur der amyloplastischen Proplastiden eine befriedigende Klarheit zu erreichen.

Abb. 21 gibt die typischen Fälle der Ausgestaltung amyloplastischer Proplastiden wieder. Die obere Reihe zeigt Proplastiden ohne Stärke und mit wenig Stärke. Die Trommelschlägelform mit einem einseitig entwickelten Stromapseudopodium ist häufig zu sehen. In diesen Fällen ist das primäre Granum leicht zu finden. Die untere Reihe zeigt Proplastiden mit einem bis vielen Stärkekörnern. Das primäre Granum liegt dann seitlich in einer dicken Stromapartie. In der Tafel, Fig. 5, 6, sind einige Mikroaufnahmen als Beleg gegeben.

Ergrünende Proplastiden

Mit Hilfe der OsO_4 -Fixation und der ausgearbeiteten Färbungsmethoden wurde die Analyse der Proplastiden in die blaßgrüne Zone junger Blätter (Abb. 13e und f) vorgetrieben. Es stellte sich dabei heraus, daß, solange die Proplastiden noch amöboid sind, eine einwandfreie Darstellung ihres Baues möglich ist. Im Zuge des Ergrünens tritt aber bald eine Metamorphose der amöboiden monogranulären Proplastiden zu Jungchloroplasten ein. Solche Jungchloroplasten haben eine feste Linsenform. Sie sind zwar mit OsO_4 in den Umrissen erhalten, aber eine Strukturanalyse am gefärbten Material war nicht möglich. Sie färben sich dann bei Anwendung der Proplastiden-Darstellungsmethode homogen. Strugger (1951) konnte für die Chloroplasten (*Agapanthus*) zeigen, daß mit OsO_4 fixierte Chloroplasten nach der Färbung homogen erscheinen, obwohl sie nach der Vitalanalyse eine deutliche Geldrollen-Grana-Struktur besitzen. Eine Aufquellung der mit OsO_4 fixierten Chloroplasten mit KOH ermöglichte erst die färberische Differenzierung der Granastruktur im erwachsenen Chloroplasten. Offenbar nimmt das Stroma im Zuge der Lamellenbildung ganz andere Eigenschaften an.

Daß Jungchloroplasten mit der Proplastidenfixierung und Färbemethodik nicht auf ihre Struktur hin untersucht werden können, ist durch umfangreiche Versuchsserien sichergestellt. Es muß die Aufgabe weiterer Arbeiten bleiben, eine Methodik zu finden, mit deren Hilfe die Metamorphose der Proplastiden zu Chloroplasten exakt cytologisch analysiert werden kann.

Die Vorstöße in dieser Richtung an *Agapanthus umbellatus* haben folgende Resultate gezeitigt:

Mikrotomserien mit der in dieser Arbeit angegebenen Methodik ergaben an blaßgrünen Blattzonen, also im ersten beginnenden Stadium des Ergrünens, noch brauchbare Bilder. Die Proplastiden ergrünen zweifellos zunächst im amöboiden monogranulären Stadium. Dann konnte als erste

Phase der Metamorphose eine Erhöhung der Teilungstätigkeit der primären Grana festgestellt werden. Das Stroma teilt sich dabei nicht, so daß polygranuläre Proplastiden entstehen, wie sie im ergrünenden Material

auch in vivo gesehen werden konnten. In ganz besonders günstigen Fällen konnte eine so starke Intensivierung der Granateilungstätigkeit beobachtet werden, daß geldrollenartige Granasäulen im Stroma nachgewiesen werden konnten.



Abb. 22. Ausschnitt aus dem Plasmawandbelag einer ergrünenden Mesophyllzelle. Die Proplastiden sind zum großen Teil schon polygranulär aber noch amöboid. Daneben die Chondriosomen.

In Abb. 22 ist aus einer ergrünenden Blattzone ein kleiner Ausschnitt aus dem Plasmawandbelag herausgezeichnet. Die beiden Proplastiden sind amöboid. Das kleine läßt soeben eine Granateilung



Abb. 23. Ergrünende, vornehmlich polygranuläre Proplastiden aus der mittleren Zone eines *Agapanthus*-Blattes.

erkennen. Das größere ist bizarr geformt und enthält mehrere Grana. Die Chondriosomen sind daneben noch sichtbar. Abb. 23 zeigt polygranuläre ergrünende Proplastiden im gefärbten Mikrotomschnitt. Im Stroma sind oft Vakuolen wie in vivo zu erkennen.

Vergleichende Fixierungsstudien mit Chondriosomen-Fixationsmitteln

Eine Durchsicht der bisherigen Literaturangaben seit 1910 läßt klar erkennen, daß bei allen Studien über die Proplastiden zwar wohl die Umrissformen mit den Befunden dieser Arbeit in Einklang gebracht werden können, daß aber keinem Autor die Existenz der primären Grana vor Augen trat. Die Ursache für diesen erstaunlichen Sachverhalt mußte erst auf experimentellem Wege geprüft werden, da die in der Literatur existierenden Abbildungen von Proplastiden entweder ganz kompakt schwarz gezeichnet sind (Guilliermond und seine Schule, s. Literaturverzeichnis), oder in den Arbeiten von Lewitzky (1910/11), Forenbacher (1911) u. a. zwar bessere Abbildungen gegeben werden, aber die Existenz eines primären Granums nirgends zu ersehen ist. Im Vergleich zu meinen eigenen Präparaten hatte ich oft den Eindruck, daß an Stelle des primären Granums in den von den älteren Autoren abgebildeten Proplastiden kleine Hohlräume gezeichnet sind. Zwischen Chondriosomen und Proplastiden sind in der älteren Literatur daher auch die Grenzen so verwischt, daß in vielen Arbeiten die Proplastiden als Chondriosomen abgebildet sind.

Ich vermutete sofort, daß die Ursache für diese Diskrepanz der Befunde in der gänzlich verschiedenen Fixierung und Färbung zu suchen ist.

Da alle Hypothesen über die Beziehungen der Plastiden zu den Chondriosomen mit Präparaten belegt wurden, welche mit den sogenannten Chondriosomen-Fixiermitteln erhalten wurden („méthodes mitochondriales“), ist es für die Theoriefassung zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden von prinzipieller Bedeutung, daß in der vorliegenden Arbeit zum ersten Male die Notwendigkeit in Erscheinung trat, die Brauchbarkeit und Verlässlichkeit der bisher allein gültigen Fixierungsmethode einer erneuten kritischen Untersuchung zu unterziehen.

Es mußte zu diesem Zwecke am nunmehr durch Vitalbeobachtung, Fixation und Färbung wohlbekannten *Agapanthus*-Material vergleichsweise die Fixationsmethode der Chondriosomenforscher parallel angewendet werden. So war es möglich, die Frage nach der Ursache zu klären, warum die primären Grana den bisherigen Beobachtern unbekannt blieben. Die Entscheidung dieser Frage kann durch ein vergleichendes Eingehen in die so heterogenen Literaturangaben nicht herbeigeführt werden. Hier muß das Experiment entscheiden.



Abb. 24. Proplastiden und Chondriosomen aus einem nicht ergrüntem Blattabschnitt. Fixiert nach Regaud.

Junge, noch nicht ergrünte Blattabschnitte von *Agapanthus umbellatus* wurden zur Kontrolle in 2% OsO_4 fixiert, geschnitten und gefärbt. Die Proplastiden

zeigten das im vorigen Kapitel dargestellte Aussehen. In jedem Proplastid war ein stark färbbares primäres Granum nachzuweisen.

Um die Frage zu prüfen, ob die Chondriosomen-Fixiermittel, welche bisher fast ausschließlich für das Studium der Plastidenanlagen gebraucht wurden, die natürliche Form und Struktur der Proplastiden konservieren können, habe ich vom gleichen Blattmaterial Blattstreifen mit folgenden Fixierungsmitteln nach Vorschrift fixiert: Regaud, Benda, Lewitzky und Carnoy. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe läßt sich kurz dahin zusammenfassen, daß in keinem Fall das primäre Granum mit regelmäßiger Sicherheit beobachtet werden konnte. Das Stroma bleibt erhalten und an Stelle des primären Granums konnte ich sehr häufig einen vakuolenähnlichen Hohlraum entdecken. Abb. 24 gibt das Fixierungs- und Färbungsbild von *Agapanthus*-Proplastiden wieder, welche mit dem Gemisch nach Regaud fixiert wurden. Chondriosomen und Proplastiden lassen sich nach Fixierung mit den bisher üblichen Mitteln so lange unterscheiden, als ihre Größe verschieden ist. In jüngsten Zellen jedoch, welche postmeristematisch sind, dürfte eine Unterscheidung kaum mehr möglich sein. Damit ist auch die Ursache für das Unbekanntbleiben der spezifischen Proplastidenstruktur aufgefunden worden. Wahrscheinlich sind Proplastiden und Chondriosomen ständig verwechselt worden.

Diskussion

Durch die in dieser Arbeit niedergelegten Befunde ist es evident geworden, daß die Embryonalphase der Chloroplasten bei den Angiospermen sich durch eine bestimmt festgelegte Struktur der stark reduzierten Plastiden auszeichnet. In den meristematischen und postmeristematischen Zellen der Angiospermen liegen die Plastiden als morphologisch klar differenziertes System vor und unterscheiden sich von den Chondriosomen grundsätzlich.

Schimper (1883 und 1885) hat bei seinen klassischen und von den späteren Forschern im Niveau nie erreichten Untersuchungen in den Blattanlagen und Meristemen monokotiler und dikotiler Pflanzen klar festgelegt, daß individualisierte Plastiden in allen Altersstadien der Zellen mikroskopisch nachzuweisen sind. Nachdem er auch in Eizellen von Angiospermen die Existenz von deutlich differenzierten Plastiden beobachten konnte, stellte er die Lehre von der Individualität und Kontinuität der Plastiden auf. Was schon Schmitz (1882) für die Algen unter Beweis stellen konnte, wird nun von Schimper konsequenterweise auf die Angiospermen übertragen.

Die Struktur der Proplastiden wurde dagegen von Schimper nicht bearbeitet. Die Existenz eines primären Granums wurde nicht erkannt. Durch die Feststellung, daß jedes Proplastid ein scheibchenförmiges primäres Granum besitzt, ist ein vollständigeres Bild von der embryonalen Phase eines Angiospermenplastids gewonnen, welches für die weitere Erforschung der Proplastiden sicherlich bedeutungsvoll ist. Die Schimper'sche Auffassung von der Selbständigkeit der Plastiden in allen Lebensphasen der Zellen hat dadurch eine weitere, nicht unbedeutende Festigung erfahren.

Es überrascht, daß das primäre Granum in der bisherigen umfangreichen Literatur nicht schon längst beschrieben wurde. Soweit ich die mir im großen Umfange zugängliche Literatur erreichen konnte, habe ich nirgends den Satz ausgesprochen gesehen, daß jedes Proplastid aus einem Stroma und einem primären Granum von Scheibchenform bestehe. Wenn überhaupt in der Literatur Vorläuferangaben existieren, welche vielleicht schon das Granum betreffen, so konnte nur in der klassischen Literatur des vorigen Jahrhunderts danach gesucht werden. A. Meyer (1883) bildet in seiner großen Arbeit „Anaplasten“ ab, welche mit den Proplastiden identisch sind. Er zeichnet kleine, rundliche Gebilde aus dem Rhizom von *Yucca filamentosa*, welche den Kern umlagern und in ihrem Innern einen oder zwei Einschlüsse besitzen. Diese Einschlüsse werden nicht näher besprochen. Er erwähnt nur, daß sie nicht Stärkekörner darstellen.

Ferner ist die Tafel II in Schimpers Arbeit (1885) bedeutsam. In Fig. 4 sind Leukoplasten aus einem jungen Niederblatt von *Canna Warszewiczii* abgebildet, welche im Stroma neben einem Stärkekorn und einem nadelförmigen „Eiweißkristall“ noch ein rundes Gebilde enthalten, welches vielleicht mit einem primären Granum identisch sein könnte. Außerdem sind die Angaben von Zimmermann (1890) in seinen „Beiträgen zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle“ hier zu erwäh-

nen. Die Leukoplasten sind nach den Angaben von Zimmermann nicht homogen, sondern sie enthalten ein bis mehrere eiweißhaltige runde Körper, welche er „Leucosomen“ nannte. Seine Fixierversuche ergaben, daß es viel schwieriger ist, diese Leucosomen im fixierten Präparat gut zu erhalten, als es beim Zellkern der Fall ist. Mit konzentrierter alkoholischer Sublimatlösung gelang es ihm, die Leucosomen in den Leukoplasten zu konservieren. Von allen versuchten Färbeverfahren eignete sich zur Darstellung der Leucosomen die Altmannsche Säurefuchsinfärbung am besten. Zimmermann gibt an, daß in diesen Präparaten nur die Nukleolen und die Leucosomen gleichwertig gefärbt seien. Die auffallende Parallele dieser elektiven Färbbarkeit mit Säurefuchsin läßt es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß die Leucosomen Zimmermanns vielleicht mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen primären Grana identisch sein könnten. Freilich sprechen auch manche Befunde Zimmermanns dagegen. Er konnte die Leucosomen nicht immer feststellen. Auch kommt Zimmermann schließlich zu der Annahme, es könnte sich um akzidentelle Eiweißkristalle handeln.

Zimmermann beschreibt in dieser Arbeit „Granula“, welche im Cytoplasma liegen und mit Säurefuchsin färbbar sind. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß diese Granula Chondriosomen darstellen und diese in Zimmermanns Arbeit erstmalig in der Literatur abgebildet sind.

Weitere Frühbeobachtungen, welche möglicherweise die primären Grana zum Gegenstand haben, konnte ich in der Literatur nicht finden.

So ist das Bild von der mikroskopischen Struktur eines Plastids in der Embryonalphase heute so korrigiert, daß Stroma und primäres Granum die wesentlichsten Strukturelemente darstellen. Das Stromaplasma besitzt charakteristische Eigenschaften. Bei der Beobachtung *in vivo* ist eine Amöboidie festzustellen. Das stimmt mit den Befunden von Senn (1908) über das Peristromium und insbesondere Küster (1911) völlig überein. Meine eigenen Beobachtungen machen es sehr wahrscheinlich, daß nicht nur die Plasmaströmung hier eine passive Formänderung der Proplastiden bewirkt. Die beobachteten Erscheinungen sprechen vielmehr für eine aktive Amöboidie des Stromaplasmas.

Das Stromaplasma ist dichter gebaut als das Cytoplasma und viel stärker färbbar als dieses. Im Stromaplasma wurden als akzidentelle Einschlüsse gelegentlich Vakuolen, sehr häufig Stärkekörner angetroffen. Die Fähigkeit, aus Zucker Stärke zu kondensieren, kommt in der Pflanzenzelle wohl nur dem Stromaplasma der Plastiden zu. Es kann also keinem Zweifel unterliegen, daß das Stromaplasma ein hochspezialisiertes plasmatisches System „*sui generis*“ in der Pflanzenzelle darstellt, welches Plasmawuchs zeigt und bei der Plastidenteilung mitwirkt.

Das in das Stromaplasma eingelagerte primäre Granum beansprucht ein besonderes Interesse. Seine Bedeutung wird durch folgende, durch Beobachtung festgelegte Tatsachen erhellt:

1. Das primäre Granum kommt in jedem Proplastid im Normalfall in der Einzahl vor.

2. Seine Gestalt ist scheibchenförmig. Parallel zur Fläche vermag es sich identisch zu reproduzieren. Diese „Teilung“ entspricht im Wesen der „Teilung“ der Chromatidenfäden im Zusammenhange mit der Mitose.

3. Es ist erwiesen, daß beim Ergrünen das primäre Granum Chlorophyll enthält.

4. Die primären Grana sind mit Kernfarbstoffen auffallend stark färbbar. Neben den Chromosomen und Nukleolen stellen sie die am stärksten färbbaren plasmatischen Zellstrukturen dar, welche uns überhaupt bekannt sind. Es kann daher mit annähernder Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß die primären Grana reichlich Nukleoproteide enthalten. Der exakte Beweis für diese Vermutung muß allerdings erst erbracht werden. Schon die identische Reproduktion und die starke Färbbarkeit sprechen aber für die Richtigkeit dieser Auffassung, besonders, da in der Literatur für die Sekundärgrana des *Agapanthus*-Chloroplasten durch H. Metzner (1952 a, b) das Vorkommen von Polynukleotiden durch mikrochemische Analysen erstmalig wahrscheinlich wurde. (Vgl. auch Chiba 1951.)

Die angeführten Beobachtungstatsachen zeigen bereits, daß das primäre Granum ebenfalls ein besonders spezialisierter Plasmakomplex ist, der ähnlich wie die Elemente des Zellkernes als individualisiertes System „sui generis“ uns entgegentritt. Dieser Komplex hat innerhalb der Pflanzenzelle besondere physiologische Aufgaben. Er hat das Vermögen, die Assimilationspigmente zu bilden. Er liegt im Proplastid als eine morphologisch geschlossene Anlage vor. Er wird bei der Metamorphose zum somatisch voll funktionsfähigen Chloroplasten, zum Ausgangspunkt der für die Photosynthese wichtigen Grana-Geldrollen-Struktur. Dabei kann noch nichts über das Zusammenwirken von Stroma- und Granum-Plasma gesagt werden. Das bleibt für zukünftige Forschungen noch offen.

Ich habe schon 1951 darauf hingewiesen, daß ein Vergleich zwischen Zellkern und Plastiden auf Grund der bisherigen Befunde durchaus erlaubt und im augenblicklichen Stadium der Zellforschung sogar schon notwendig geworden ist. Beide Organelle stellen als deutlich abgegrenzte mikroskopische Zellelemente ein wohlgeordnetes Duplikantensystem dar. Der Zellkern kann als embryonaler Kern sich in allen seinen Teilen identisch reproduzieren. Im Soma kann dieses Vermögen verlorengehen. Das embryonale Plastid, das Proplastid ist in allen seinen Teilen zur identischen Reproduktion befähigt. Erfolgt die Metamorphose zum somatischen Plastid, so geht auch hier das Vermögen zur identischen Reproduktion allmählich verloren. Das gilt freilich nur für die hochdifferenzierten Anthophyten. Schon bei den Moosen (Kaja 1954) und besonders bei den Algen (Schmitz 1882) ist die embryonale und somatische Lebensphase bei Plastiden und Kernen identisch. Der Zellkern ist ein nematisch organisiertes Organell. Das Plastid ist ein lamellär organisiertes Gebilde. Im Zellkern kommt eine identische Reproduktion ohne Kernteilung vor, welche zur Polytenie führt. Im Plastid ist bei der Differenzierung der somatischen Struktur eine identische Reproduktion der Grana beobachtet, welche zur Geldrollenbildung führt, ohne daß das Plastid sich regelmäßig teilt. Beide Organelle sind komplexe Duplikantensysteme. Die Kontinuität des Kernes steht außer

Zweifel; die Kontinuität der Plastiden ist schon von Schimper mit Recht postuliert worden.

Nachdem auf dem Wege der Strukturanalyse die Plastiden als Zellorganelle „sui generis“ erkannt sind und das Phänomen der identischen Reproduktion bei der Teilung der Proplastiden zum ersten Male außerhalb des Zellkernes beobachtet wurde, erscheint es notwendig, unsere Auffassung von der Organisation der Zelle einer theoretischen Revision zu unterziehen.

Der Begriff „Plasmawuchs“ hat für die Betrachtung des lebendigen Stoffsystems eine besondere Bedeutung. Es besteht wohl kein Zweifel, daß beim Wachstum des Protoplasmas eine Vermehrung desselben erfolgt, bei welcher die spezifische Feinstruktur artgemäß erhalten bleibt. Dies erscheint aber nur möglich, wenn es Plasmakonstituenten gibt (Michaelis 1947), welche man auch als elementare Duplikanten bezeichnen kann. Diese im Bereich des Submikroskopischen liegenden Elementarduplikanten müssen die Befähigung haben, in identischer Form beim Plasmawuchs synthetisiert zu werden. Nicht nur jeder Elementarduplikant wird identisch reproduziert, sondern es muß beim Plasmawachstum auch das artgemäße Gefüge dieser Elementarduplikanten identisch erhalten bleiben. So kommen wir aus einer rein theoretischen Erwägung heraus zur sehr wahrscheinlichen Annahme eines Gefügebauers aller im Lichtmikroskop sichtbaren plasmatischen Strukturen der Zelle aus Elementarduplikanten, denen wir auch ganz allgemein den Namen Steuerungszentren zubilligen dürfen.

Eine bedeutende Stütze für eine solche Auffassung ist die Tatsache der plasmatischen Vererbung, welche von der Genetik (Correns 1901, 1909, 1919, 1924, 1931, 1937, Wettstein 1928, Renner 1934, Michaelis 1938, Oehlkers 1953) sichergestellt ist. Darlington (1944) geht sogar so weit, daß er den klassischen Karyogenen die Plasmagene gegenüberstellt. Das Genom, welches in den Chromosomen des Zellkerns lokalisiert ist, hat zweifellos eine dominierende Sonderstellung. Dennoch sind wir gezwungen, für die Durchführung der Stoffwechseltätigkeit in der Zelle nichtmendelnde Steuerungszentren außerhalb des Kernes im Cytoplasma und in den Zellorganellen anzunehmen, welche es der Zelle überhaupt erst ermöglichen, ihre Lebenstätigkeit durchzuführen (vgl. auch Marquardt 1952).

Wenn vom Gesichtspunkt der klassischen Genetik aus eine streng karyogenetisch formulierte Zellentheorie bisher das Feld beherrschte, so ist es vom Gesichtspunkt der Physiologie und der cytologischen Strukturforchung aus durchaus berechtigt, eine pangenetische Formulierung des Zellbegriffes zu erörtern.

Konsequenterweise müßten wir den gesamten Protoplasten in allen seinen plasmatischen Teilen als ein Gefügesystem von elementaren Steuerungszentren (Elementarduplikanten) ansehen. Würden wir dem Vorschlag Darlington's (1944) folgen, so müßte der klassische Begriff „Gen“ zu einem umfassenden Oberbegriff für steuernde Konstituenten der lebendigen Materie erhoben werden. Was die Genetik bisher als Gene bezeichnete, wären dann die Karyogene. Diese müßten zu einem Karyogenom zusammengefaßt werden. Der von Wettstein geschaffene Begriff

Plasmon würde dann die Gesamtheit aller Plasmagene im Sinne Darlington's umfassen.

Es fragt sich, ob der Nomenklaturvorschlag Darlington's zweckmäßig ist. Der Begriff Gen ist in der Vererbungsliteratur so festgelegt, daß die pangenetische Formulierung des Zellbegriffes vielleicht zweckmäßigerweise unter Beibehaltung des Begriffes Gen im klassischen Sinne formuliert werden könnte. Dann müßte man sich auf folgende Formulierung einigen: Alle plasmatischen Teile einer Zelle bestehen aus elementaren steuernden und identisch reduplikablen Konstituenten (Elementarduplikanten). Innerhalb des Zellkerns sind solche Konstituenten entwickelt, welche im Sinne der Genetik als Gene festgelegt sind. Ihre Gesamtheit bildet das Genom. Die extranukleären plasmatischen Strukturen der Zelle bestehen ebenfalls aus einem Gefüge von Elementarduplikanten. Die Summe aller dieser Steuerungszentren muß im Sinne Wettsteins als Plasmon gekennzeichnet sein. Das Plasmon bedarf aber schon auf Grund des bisher erarbeiteten Tatsachenmaterials einer Aufgliederung. Alle steuernden Elementarkonstituenten im Cytoplasma stellen das Cytoplasmon dar. Unsere Kenntnisse über die Natur und Funktion des Cytoplasmons sind äußerst gering. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um Konstituenten, welche wichtige vegetative Lebensfunktionen steuern. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit läßt sich dagegen für die Gesamtheit aller Konstituenten, welche das Plastidensystem aufbauen, schon mehr aussagen. Dieses Plastidom beherrscht weitgehend die Photosynthese und die Zuckerkonsolidation zu Stärke. Im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit niedergelegten lichtmikroskopischen Strukturanalyse an den embryonalen Proplastiden kann gesagt werden, daß sowohl im Stromaplasma als auch im Plasma des Granums verschiedene elementare Konstituenten enthalten sein müssen, welche ein System *sui generis* darstellen und etwa folgende Funktionen steuern.

1. Elementare Konstituenten, welche im Stromaplasma lokalisiert sind. Sie befähigen das Stromaplasma zur Stärkebildung aus Zucker.
2. Elementare Konstituenten, welche den Plastiden die potentielle Fähigkeit zur Pigmentbildung und zur Metamorphose verleihen. Diese Konstituenten müssen im Plasma des Granums und des Stromas lokalisiert sein.

3. Elementare Konstituenten, welche die Plastiden im somatisch differenzierten Zustand befähigen, die Photosynthese durchzuführen.

Welche Steuerungszentren sonst noch in den Plastiden lokalisiert sind, läßt sich zur Zeit nicht aussagen.

Auch die Chondriosomen, welche Perner (1952 a, b, 1953), Perner und Pfefferkorn (1953) näher bearbeitet haben, sind plasmatischer Natur. Auch sie sind ein kontinuierliches Organellsystem und vermehren sich durch Teilung. Wir müssen in Zukunft alle auffindbaren Elementarkonstituenten in den Chondriosomen als Chondriom zusammenfassen.

Die Sphärosomen (Dangeard 1919) sind nach den Untersuchungen von Perner (1952, 1953) ebenfalls plasmatischer Natur. Sie sind mit den in der früheren Literatur als Mikrosomen bezeichneten Gebilden identisch und

heben sich bei Dunkelfeldbetrachtung besonders gut hervor. Nachdem Perner (1952) den Nachweis erbringen konnte, daß sie den Sitz der Cytochromoxydase darstellen, können wir mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß auch sie aus elementaren Konstituenten aufgebaut sind, welche unter dem Begriff Sphaerom zusammengefaßt werden.

So muß der Gesamtaspekt einer embryonalen Pflanzenzelle auf Grund der neueren Befunde revidiert werden. In Abb. 25 ist das Bild einer embryonalen Pflanzenzelle schematisch nach dem mitgeteilten Stande der Forschung dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber ist das Vakuom nicht eingezeichnet. Alle lichtmikroskopisch nachweisbaren plasmatischen Strukturen dagegen haben dabei eine Berücksichtigung gefunden.

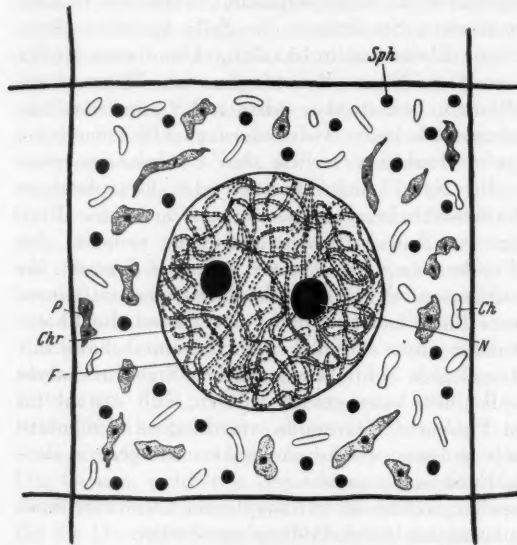


Abb. 25. Die schematische Darstellung einer embryonalen Pflanzenzelle. Das Vakuolensystem ist nicht eingezeichnet. N: Nukleolen; Chr: Chromomeren; F: Chromonema; P: Proplastiden; Ch: Chondriosomen; Sph: Sphärosomen.

Werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit so in das Gesamtbild der Zelle eingeordnet, so ist die

Auseinandersetzung zwischen der Schimperschen Auffassung und der Auffassung Guilliermonds und seiner Schule, also kurz gesagt die Auffassung der Chondriosomentheoretiker, ein untergeordnetes Problem. Es geht dabei um die Frage, ob die Plastiden ein selbständiges Duplikantensystem oder ob die Plastiden und Chondriosomen entwicklungsgeschichtlich identisch sind.

Die Theorie des Ursprungs der Plastiden aus den Chondriosomen ist auf Grund folgender Beobachtungen aufgestellt worden:

1. Chondriosomen und Plastiden sind in der erwachsenen Pflanzenzelle sehr verschieden, in der embryonalen und postembryonalen Zelle können beide Elemente in ihrer Form und Größe sehr ähnlich sein.

2. Bei der Analyse von jugendlichen Zellen, welche mit chromsäure-, bichromat- oder essigsäurehaltigen Fixiermitteln fixiert sind, ist ein struktureller Unterschied zwischen den Proplastiden und den Chondriosomen nicht mehr zu beobachten.

Mehr „Beweise“ für die Richtigkeit der Chondriosomentheorie der Plastidenentstehung haben die Autoren, welche sich für diese Auffassung aussprachen, nicht erbringen können. Wenn man die Bilder von Lewitzky (1910, 1911) und Guilliermond (1933) betrachtet, so hat man unbedingt den Eindruck, daß hier als Chondriosomen einmal Proplastiden und das andere Mal wirkliche Chondriosomen gemeint sind.

Die in der Literatur angeführten Gründe, welche für den Ursprung der Plastiden aus den Chondriosomen sprechen, lassen sich heute nicht mehr zwingend aufrechterhalten. Die verfeinerte Strukturanalyse des Chondriosoms und der Plastiden hat gezeigt, daß hier so große und konstante Strukturunterschiede bestehen, daß von einer Identität der beiden Systeme nicht die Rede sein kann.

So werden in dieser Arbeit die Ergebnisse von Noack (1921) u. a. weiter gefestigt und dadurch die Schimpersche Lehre von der Kontinuität der Plastiden aufs neue bestätigt. Mikrochemische Analysen werden in Zukunft noch zu zeigen haben, daß Proplastiden und Chondriosomen grundverschiedene Elemente der Zelle sind.

Schließlich ist noch eine neue Hypothese zu diskutieren, welche von de Rezende-Pinto (1948 a, b, c; 1949; 1952) recht bestimmt vertreten wird. De Rezende-Pinto steht auf dem Standpunkt, daß die Plastiden im Sinne Schimpers ein eigenes Organellesystem darstellen, er hat aber im Hinblick auf die Struktur der somatischen Plastiden ganz eigene und neue Vorstellungen. Er glaubt, daß die embryonale Phase der Plastiden, die er „Proplasten“ nennt, von den Chondriosomen zu trennen sei. Die primären Grana bleiben ihm bei seinen Methoden unbekannt. Diese Proplasten entwickeln sich zunächst zu Leukoplasten, welche Stärke bilden können. Das sind wohl die amyloplastischen Proplastiden in dieser Arbeit. Über Amylo-Chloroplasten entwickelt sich dann der typische Chloroplast.

Der fertige Chloroplast soll nicht lamellär, sondern nematisch gebaut sein. Ein bandförmiges „Chloroplastonema“, welches ähnlich wie die Chromonemata des Zellkerns abwechselnd aus nicht doppelbrechenden Zwischenstücken und doppelbrechenden Granascheibchen besteht, ist nach dieser Auffassung im Chloroplastenstroma schraubig angeordnet. Beim Ergrünen der Amyloplasten soll nach de Rezende-Pinto das Chloroplastonema vom Cytoplasma gebildet werden. Dazu muß folgendes bemerkt werden:

Daß de Rezende-Pinto die primären Grana nicht gesehen hat, ist ein methodisches Problem, welches in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt ist. Ein nematischer Bau der Chloroplasten im Sinne dieser Chloroplastonema-Hypothese läßt sich außer in den Arbeiten de Rezende-Pintos nicht in der umfangreichen Literatur belegen. Die Arbeiten Menkes (1938, 1943) über die optischen Eigenschaften der Chloroplasten, die nachgewiesene Geldrollenstruktur des Granabaus (Strugger 1951) sowie die im Phasenkontrastmikroskop erwiesene Lamellenstruktur des Chloroplasten (Strugger 1947) sprechen grundsätzlich gegen diese Auffassung. Auch die neuesten elektronenmikroskopischen Befunde von Steinmann (1952) bestätigen den lamellaren Aufbau der Chloroplasten. Die angebliche Be-

teilung des Cytoplasmas ist so problematisch, daß jeder Kenner der Materie aus den tatsächlichen Angaben de Rezende-Pintos keinen zwingenden Beweis für diese Behauptung entnehmen kann.

Weitere Forschungen sollen in dieser Richtung sicherlich angesetzt werden. Die Arbeiten de Rezende-Pintos regen dazu an, und darin sehe ich augenblicklich ihren Hauptwert.

Ohne das Erscheinen meiner vorliegenden ausführlichen Arbeit abzuwarten (meine Publikation 1950 ist eine vorläufige Mitteilung), haben sich Heitz und Maly (1953) mit dem Problem der Proplastiden und ihrer Entwicklung zum fertigen Chloroplasten an dem von mir gewählten Hauptobjekt beschäftigt. Als Methodik verwenden die beiden Autoren die vitale Hellfeldbeobachtung und die vitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Daneben wird die von mir 1936 eingeführte Vitalfärbung mit Rhodamin B herangezogen, welche aber nur an annähernd erwachsenen Zellen anwendbar ist und daher bei den von Heitz und Maly herangezogenen jungen Geweben aus grundsätzlichen Gründen heraus versagen mußte. In bezug auf das regelmäßige Vorkommen eines primären Granums kommen beide Forscher zu Resultaten, welche dieser Arbeit widersprechen. Es wird das Vorkommen eines primären teilbaren Granums in den Proplastiden kurzerhand negiert. Das ist mir völlig verständlich, denn mit Hilfe der Hellfeldbeobachtung können die primären Grana erst dann gesehen werden, wenn sie Pigmente enthalten. Es ist auch in dieser Arbeit aufgezeigt worden, daß die Proplastiden im pigmentfreien Zustand in vivo völlig strukturlos erscheinen, da das primäre Granum nicht gesehen werden kann. Die intravitale Färbung mit Rhodamin B gelingt nach Strugger (1956) nur an älteren Zellen. Junge Zellen vermögen das Rhodamin B im intakten Zustande nicht zu speichern, und daher mußte auch die Bestrebung von Heitz und Maly, das primäre Granum in postembryonalen Zellen vitalfärberisch nachzuweisen, von vornherein ein negatives Resultat ergeben.

Was für die Hellfeldbeobachtung gilt, ist auch in gleichem Umfang für die fluoreszenzmikroskopische Analyse des primären Granums ausschlaggebend. Im völlig pigmentfreien Zustand kann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops gewiß ein primäres Granum nicht gesehen werden. Ergrünt das Proplastid, so konnten auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Heitz und Maly die starke Fluoreszenz des primären Granums feststellen (vgl. Abb. 13, 15, 16 in der Arbeit von Heitz und Maly). Es besteht sonach kein Zweifel, daß das Granum ein Ort verstärkter Chlorophyllanreicherung ist. Eine Differenz ergibt sich aber in der Frage, ob auch das Stroma im jugendlichen Chloroplasten Chlorophyll führen kann. Diese Frage ist auch für den erfahrenen Fluoreszenzmikroskopiker bei der Kleinheit der Objekte und bei den komplizierten Verhältnissen selbstleuchtender Strukturen sehr schwer mit Sicherheit zu entscheiden, und Heitz und Maly geben ihrer Unsicherheit an einigen Stellen ihrer Arbeit auch einen deutlichen Ausdruck. Die Frage, ob das Chlorophyll im Stroma ebenfalls gebildet werden kann, ist auch nach der Arbeit von Heitz und Maly noch als unentschieden zu betrachten. Mit Sicherheit

kann aber gesagt werden, daß die Grana auch beim Ergrünen die Pigmente in höherer Konzentration führen. Auf Grund von fluoreszenzoptischen Befunden die Existenz eines primären Granums in nicht pigmentierten Proplastiden zu bezweifeln, ist aber methodisch nicht zulässig. Das zeigt klar die vorliegende Arbeit.

Ich habe deshalb fixierungscytologische Methoden angewandt, weil die Vitalanalyse dabei versagte. Die vorliegende Arbeit zeigt an einem umfassenden Untersuchungsmaterial, welches inzwischen noch auf weitere Pflanzen ausgedehnt wurde, daß die Proplastiden ein kontinuierliches Strukturelement führen, welches nicht neu im Stroma entsteht, sondern sich durch Teilung vermehrt. Damit ist aber die Kritik von Heitz und Maly in ganz wesentlichen Punkten als überholt anzusehen.

Wenn Heitz und Maly meine Ergebnisse an *Helodea* aus dem Jahre 1936 mit meiner vorläufigen Mitteilung aus dem Jahre 1950 über *Agapanthus* und andere Pflanzen vergleichen, so muß ich die Feststellung machen, daß bei diesem Vergleich leider von den beiden Autoren ein Unterschied zwischen den Objekten übersehen wurde. Ich habe 1936 an etiolierten Blättern von *Helodea* den Ergrünungsvorgang erstmalig studiert. 1950 und in der vorliegenden Arbeit wird das normale Entwicklungsgeschehen beschrieben. Ich weiß inzwischen, daß etiolierte Plastiden andere Verhältnisse aufweisen als normale Plastiden. Darüber wird eine ausführliche Arbeit von Böing in der nächsten Zeit erscheinen. Im übrigen kann ich schon mitteilen, daß in den Urmeristemen auch anderer Angiospermen die Proplastiden ein teilbares primäres Granum führen, daß Perner in nächster Zeit der Öffentlichkeit Mikrophotographien vorlegen wird, in denen das primäre Granum von Leukoplasten und Proplastiden mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie belegt wird, und daß ferner in einer Arbeit von Bartels die Granaführung der Leukoplasten unter Beweis gestellt wird und schließlich Kaja in einer Arbeit die Kontinuität der Granastruktur bei den Moosen untersucht und bewiesen hat.

Böing hat an *Helodea* den Teilungsvorgang des primären Granums in vivo verfolgen können. Diese Arbeiten werden bald erscheinen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Vitaluntersuchungen an jüngsten und älteren Blättern von *Agapanthus umbellatus* wurden an Mesophyllzellen durchgeführt und ergaben folgende Befunde:

Die Proplastiden sind in den jüngsten Blättern stark mit Stärke beladen. Die Stärkekörner sind von einem plasmatischen Stroma eingehüllt. Zwangsformen sind durch die oft großen Stärkekorneinschlüsse die Regel. In der basalen, völlig weißen Zone junger größerer Blätter sind die Proplastiden stärkefrei. Ihre Form ist einem ständigen amöboiden Wechsel unterworfen. Im Stadium des ersten Ergrüens sind die Proplastiden noch amöboid. Das Chlorophyll tritt in kleinen Einschlüssen des Stromas in Erscheinung, welche in Einzahl, Zweizahl oder Mehrzahl in vivo in solchen ergrünenden Plastiden sichtbar sind. Die Lokalisation des Chlorophylls in diesen Granascheibchen ist auch fluoreszenzoptisch nachzuweisen.

Die Chondriosomen sind in Form und Größe von den Proplastiden stark verschieden.

2. Untersuchungen mit Hilfe der Vitalfärbung mit Rhodamin B ließen *intra vitam* erkennen, daß die Proplastiden in den nicht ergrünzten Blattzonen der Basis älterer Blätter aus einem Stroma und aus einem scheibchenförmigen primären Granum bestehen, welches auch bei Beginn des Ergrünnens den Ort der Pigmentbildung darstellt.

3. Durch Fixierung mit 2%iger Osmiumsäure und durch Einbettung in Paraffin wurden Schnittserien durch junge Blätter angefertigt. Eine Färbung mit Viktoriablau, Safranin T, Rosanilin, Fuchsin, Pyronin und insbesondere Säurefuchsin nach Altmann ist geeignet, das Stroma schwach und das primäre Granum stark gefärbt hervorzuheben, so daß der reelle Bau der Proplastiden in gefärbten Mikrotomschnitten studiert werden konnte. Gleichzeitig brachte die OsO_4 -Fixation und Färbung mit den geeigneten Farbstoffen auch eine reelle Darstellung der Chondriosomen.

4. Die Auswertung der Mikrotomserien, welche wohl erstmalig unveränderte Proplastiden enthielten, ergab folgendes Resultat:

Im postembryonalen jüngsten Mesophyll sind die Proplastiden selten stärkefrei. Sind sie amyloplastisch, so werden die Stärkekörner eindeutig von einem plasmatischen Stroma umhüllt. An einer Stelle ist regelmäßig ein scheibchenförmiges, sehr stark mit Kernfarbstoffen färbbares Granum zu sehen. Führen sie keine Stärke, so sind sie meist chondriosomenähnlich spindelförmig, aber größer als die typischen Chondriosomen und führen im schwach färbbaren Stroma immer in Einzahl ein stark färbbares primäres Granum. Die kleineren Chondriosomen lassen niemals einen solchen Einschuß erkennen.

In der weißen Streckungszone sind die Proplastiden amöboid und lassen regelmäßig ein primäres Granum als rundes Scheibchen erkennen.

In der ersten Ergrünungszone bleiben die Proplastiden zunächst amöboid und monogranulär. Dann setzt später eine Vermehrung der primären Grana ein. Innerhalb der Streckungszone und der postembryonalen Zone der Blätter konnte einwandfrei eine Teilung der Proplastiden beobachtet werden. Sie geht regelmäßig so vor sich, daß das scheibchenförmige primäre Granum identisch reproduziert wird. Ist die Verdoppelung vollzogen, so weichen die Tochterscheibchen auseinander und es schnürt sich allmählich das Stroma ein. Es entstehen so Tochterproplastiden mit völlig gleichem Bau. Bei der Zellteilung konnte erneut *in vivo* die relativ gleichmäßige Verteilung der Proplastiden an den Zellpolen bei der Anaphase bestätigt werden.

5. Alle Ergebnisse dieser Arbeit sprechen entschieden gegen den Ursprung der Plastiden aus den Chondriosomen. Proplastiden und Chondriosomen sind in den jüngsten Blattzellen grundverschieden gebaut und haben auch verschiedene Funktionen. Die Kontinuitätstheorie von Schimper wird dadurch erneut bestätigt.

6. Da die Fixiermittel für die Konservierung der Chondriosomen, die „*méthodes mitochondriales*“ der französischen Schule, zwar wohl die Um-

rißformen der Proplastiden erhalten, aber das primäre Granum in den meisten Fällen zerstören, ist auch die Ursache für die Aufstellung der Theorie des Ursprungs der Plastiden aus den Chondriosomen in der vorliegenden Arbeit aufgedeckt worden. Chondriosomen und Proplastiden wurden in der Literatur der letzten 50 Jahre ständig verwechselt.

7. In der Diskussion wird die Zellentheorie in Beziehung zu den neuen Befunden gebracht. Eine ausschließlich karyogenetische Fassung der Zellentheorie muß heute abgelehnt werden. Eine pangenetische Fassung der Zellentheorie wird erörtert. Das Bild der embryonalen Angiospermienzelle wird revidiert.

Literatur

- Alvarado, S., 1925: Die Entstehung der Plastiden aus Chondriosomen in den Paraphysen von *Mnium cuspidatum*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 41, 85.
- Beauverie, J., 1928: Sur les mitochondries dites « inactives » ou « aplastogènes » ou « cytosomes ». Bull. Soc. Bot. France 75, 83.
- Belzung, E., 1887: Recherches morphologiques et physiologiques sur l'amidon et les grains de chlorophylle. Ann. sc. nat. Bot. V, Ser. 7, 179.
- 1891: Nouvelles recherches sur l'origine des grains d'amidon et des grains chlorophylliens. Ann. sc. nat. Bot. 13, Ser. 7, 1.
- Boehm, J., 1856: Beiträge zur näheren Kenntnis des Chlorophylls. Sitzungsber. Wiener Akad. Wiss. 22.
- Bowen, B. H., 1928: Studies on the structure of plant protoplasm I. The osmophilic platelets. Z. Zellforschung 6, 689.
- 1929: Studies on the structure of plant protoplasm II. Z. Zellforschung 9, 1.
- 1929: The distribution of the plastidome during mitosis in plerome cells of *Rizinus*. Cellule 39, 121.
- Chiba, Y., 1951: Cytochemical studies on chloroplasts. I. Cytologic demonstration of nucleic acids in chloroplasts. Cytologia 16, 259.
- Correns, C., 1901: Die Ergebnisse der neuesten Bastardforschung für die Vererbungslehre. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 19, (71).
- 1909: Zur Kenntnis der Rolle von Kern und Plasma bei der Vererbung. Z. f. ind. Abst.- u. Vererbungsl. 2, 331.
- 1919, 1924: Vererbungsversuche mit buntblättrigen Sippen I. Sitzungsber. Akad. Wiss. Berlin, phys.-math. Kl. Nr. 34, 585, Ges. Abh. 965.
- 1931: Vererbungsversuche mit buntblättrigen Sippen VIII, IX, X, XI. Sitzungsber. Akad. Wiss. Berlin, phys.-math. Kl. X, XI, 205.
- 1937: Nicht mendelnde Vererbung. Handb. d. Vererbungsl. Berlin.
- Dangeard, P. A., 1918: Sur la nature du chondriome et son rôle dans la cellule. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 167.
- 1919: Nouvelles recherches sur la nature du chondriome et ses rapports avec le system vacuolaire. Bull. Soc. Bot. France.
- 1919: Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. Compt. Rend. Acad. Sci. 169, 1005.
- Darlington, C. D., 1944: Heredity development and infection. Nature 154, 164.
- Doutreligne, S. J., 1935: Note sur la structure des chloroplastes. Kon. Proc. Acad. v. Wetensch. Amsterdam 38, 886.

- Düvel, D., und W. Mevius jr., 1952: Zur Fluoreszenz der Granen im Chloroplasten. *Naturw.* 39, 25.
- Emberger, L., 1920: Étude cytologique de la Sélaginelle. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 171, 265.
- 1920: Évolution du chondriome chez les cryptogames vasculaires. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 170.
- 1920: Étude cytologique des organes sexuels des Fougères. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 171.
- 1920: Évolution du chondriome dans la formation du sporange chez les Fougères. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 171.
- 1921: Recherches sur l'origine et l'évolution des plastides chez les Pteridophytes. Thesis, Univ. Lyons.
- 1922: Nouvelle contribution à l'étude cytologique des Sélaginelles. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 1922, II.
- 1922: Sur l'évolution des plastides chez les végétaux (Équisetacées). *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 1922.
- Forenbacher, A., 1911: Die Chondriosomen als Chromatophorenbildner. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 29, 648.
- Frey-Wyssling, A., 1938: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin 1938.
- 1938: Der Aufbau der Chlorophyllkörner (Sammelref.). *Protoplasma* 29, 279.
- und K. Wuhrmann, 1947: Zur Optik der Chloroplasten. *Helv. chim. Acta* 30, 20. Ref.: *Ber. wiss. Biol.* 68, 32.
- und K. Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyllkörner. *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. in Zürich* 94, 179.
- Geitler, L., 1957: Über den Granabau der Plastiden. *Planta* 26, 463.
- Guilliermond, A., 1911: Sur les mitochondries des cellules végétales. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 153, 199.
- 1911: Sur l'origine des leucoplastes et sur les processus cytologiques de l'élaboration de l'amidon dans le tubercule de pomme de terre. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 153, 1492.
- 1911: Sur la formation des chloroleucites aux dépens des mitochondries. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 153, 290.
- 1912: Sur les leucoplastes de *Phajus grandiflorus* et leur identification avec les mitochondries. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 154, 286.
- 1912: I. Nouvelles remarques sur l'origine des Chloroleucites. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 72, 86.
- 1912: Quelques remarques sur le mode de formation de l'amidon dans la cellule végétale. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 72, 276.
- 1912: Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastides des végétaux (leuco-, chromo- et chloroplastes). Contribution à l'étude des mitochondries des cellules végétales. *Arch. d'anat. microscop.* 14.
- 1912: Sur le mode de formation des chloroleucites dans le bourgeons des plantes adultes. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 72, 459.

- Guilliermond, A., 1912: Sur les mitochondries des organes sexuels des végétaux. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 154, 888.
- 1912: Mitochondries et plastes végétaux. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 73, 7.
 - 1912: Sur les différents modes de la formation des leucoplastes. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 73, 110.
 - 1912: Sur le mode de formation du pigment dans la racine de Carotte. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 155, 411.
 - 1913: Sur l'étude vitale du chondriome de l'épiderme des pétales d'Iris germanica et de son évolution en leuco- et chromoplastes. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 74, 1280.
 - 1913: Nouvelles remarques sur la signification des plastes de W. Schimper par rapport aux mitochondries actuelles. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 75, 437.
 - 1914: Nouvelles remarques sur les plastes des végétaux. Évolution des plastes et des mitochondries dans les cellules adultes. *Anat. Anz.* 46.
 - 1914: Bemerkungen über die Mitochondrien der vegetativen Zellen und ihre Verwandlung in Plastiden. Eine Antwort auf einige Einwürfe. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 32, 282.
 - 1914: État actuel de la question de l'évolution et du rôle physiologique des mitochondries. *Rev. gén. Bot.* 26.
 - 1919: Sur l'origine mitochondriale des plastides à propos d'un travail de Mottier. *Ann. Sci. nat.* 10, T. 1.
 - 1919: Sur le chondriome et les formations ergasto-plasmiques du sac embryonnaire des Liliacées. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 169, II.
 - 1919: Observations vitales sur le chondriome des végétaux et recherches sur l'origine des chromoplastides et le mode de formation des pigments xanthophylliens et carotiniens. *Rev. gén. Bot.* 31, 372, 446, 532, 635.
 - 1919: Sur l'origine mitochondriale des plastides. *Ann. sc. nat. bot., Sér. X.* 14, 226.
 - 1920: Nouvelles remarques sur la coexistence de deux variétés de mitochondries dans les végétaux chlorophylliens. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 83.
 - 1920: Sur l'évolution du chondriome pendant la formation des grains de pollen de *Lilium candidum*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 170.
 - 1920: Sur la coexistence dans la cellule végétale de deux variétés distinctes de mitochondries. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 83.
 - 1920: Sur les éléments figurés du cytoplasme. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 170.
 - 1920: Sur l'évolution du chondriome dans la cellule végétale. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 170.
 - 1921: A propos d'un travail de Meves sur le chondriome de la cellule végétale. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 84.
 - 1921: Sur les caractères et l'évolution du chondriome dans les végétaux chlorophylliens. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris* 84.
 - 1921: Observations cytologiques sur le bourgeon d'*Elodea canadensis*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 173.
 - 1921: Sur l'évolution du chondriome et la formation des chloroplastes dans l'*Elodea canadensis*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 85.
 - 1921: Nouvelles observations sur l'origine des plastides dans les Phanérogames. *Rev. gén. Bot.* 33.
 - 1922: Remarques sur la formation des chloroplastes dans le bourgeon d'*Elodea canadensis*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 175, 283.
 - 1923: Nouvelles observations sur l'évolution du chondriome dans le sac embryonnaire des Liliacées. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 177.

- Guilliermond, A., 1924: Recherches sur l'évolution du chondriome pendant le développement du sac embryonnaire et des cellules mères des grains de pollen dans les Liliacées et sur la signification des formations ergasto-plasmiques. Ann. Sci. natur. 10, sér. 6.
- 1925: Sur l'instabilité des formes et la permanence des mitochondries. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 180.
- 1927: Observations vitales sur l'instabilité des formes des mitochondries et sur leur permanence. Bull. biol. France et Belg. 61.
- Guilliermond, A., G. Mangenot et L. Plantefol, 1935: Traité de cytologie végétale. Paris.
- Haberlandt, G., 1877: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner in den Keimblättern von *Phaseolus vulgaris*. Bot. Ztg. 35, 376.
- Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromocentren. Planta 18, 616.
- 1936: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 54, 362.
- 1937: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta 26, 134.
- Heitz, E., und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforschung 8, 245.
- Homes, M., 1929: Observations vitales sur la structure et la division cellulaire de *Halopteris filicina* (Grat.) Kütz. Bull. Acad. R. Belgique, Cl. Sc. Sér. VI, 15, 932.
- Kaja, H., 1954: Untersuchungen über Entwicklung und Struktur der Moosplastiden. Diss. Münster, im Erscheinen.
- Küster, E., 1911: Über amöboide Formveränderungen der Chromatophoren höherer Pflanzen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 29, 362.
- 1935: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Lewitzky, G., 1910: Über die Chondriosomen in pflanzlichen Zellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 28, 538.
- 1911: Die Chloroplastenanlagen in lebenden und fixierten Zellen von *Elodea canadensis* Rich. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 29, 697.
- 1911: Vergleichende Untersuchung über die Chondriosomen in lebenden und fixierten Pflanzenzellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 29, 685.
- Ma, R. M., 1928: The chloroplasts of *Isoetes melanopoda*. Amer. Journ. Bot. 15, 277.
- 1930: The chloroplasts of *Selaginella*. Bull. Torrey Bot. Club 52, 277.
- Mangenot, G., 1920: Sur l'évolution des chromatophores et le chondriome chez les Floridées. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 170, 1595.
- 1920: Sur l'évolution du chondriome et des plastes chez les Fucacées II. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 170, 200.
- Marquardt, H., 1952: Die Natur der Erbträger im Zytoplasma. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 65, 198.
- Marquette, W., 1907: Manifestations of polarity in plant cells, which apparently are without centrosomes. Beih. Bot. Zbl. 21, 281.
- Menke, W., 1938: Polarisationsoptische Untersuchungen zur Frage der Chloroplastenstruktur. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 56, (27).
- 1938: Untersuchungen der einzelnen Zellorgane in Spinatblättern auf Grund präparativ-chemischer Methodik. Z. Bot. 52, 273.
- 1938: Über den Feinbau der Chloroplasten. Kolloid-Z. 85, 256.
- 1940: Untersuchungen über den Feinbau des Protoplasmas mit dem Universal-Elektronen-Mikroskop. Protoplasma 35, 115.

- Menke, W., 1940: Die Lamellarstruktur der Chloroplasten im ultravioletten Licht. Naturwiss. 28, 158.
- 1943: Dichroismus und Doppelbrechung der Plastiden. Biol. Zbl. 63, 326.
- Menke, W., und F. Koydl, 1939: Direkter Nachweis des lamellaren Feinbaues der Chloroplasten. Naturwiss. 27, 29.
- Metzner, H., 1952: Über den Nachweis von Nucleinsäure in den Chloroplasten höherer Pflanzen. Naturwiss. 39, 64.
- 1952: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. Biol. Zbl. 71, 257.
- Meves, Fr., 1904: Über das Vorkommen von Mitochondrien bzw. Chondriomiten in Pflanzenzellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 22, 284.
- 1916: Die Chloroplastenbildung bei den höheren Pflanzen und Allinante von A. Meyer. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 34, 333.
- 1917: Historisch-kritische Untersuchungen über die Plastosomen der Pflanzenzellen. Arch. mikr. Anat. 89.
- Meyer, A., 1882: Über Chlorophyllkörner, Stärkebildner und Farbkörper. Bot. Zbl. XII, 314.
- 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig.
- 1911: Bemerkungen zu G. Lewitzky: Über die Chondriosomen in pflanzlichen Zellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 29, 158.
- 1916: Die Allinante. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 34, 168.
- 1920: Morphologische und physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere. Jena.
- 1926: Morphologische und physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere. Jena.
- Michaelis, P., 1938: Über die Konstanz des Plasmons. Z. induct. Abst. u. Vererb.-Lehre 74, 435.
- 1947: Über das genetische System der Zelle. Naturw. 34, 18.
- Mikosch, C., 1879: Untersuchungen über die Entstehung der Chlorophyllkörner. Sitzungsber. Kais. Akad. Wiss. Wien 78, I, 265.
- 1885: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner. Sitzungsber. Kais. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. 92, I, 168.
- Mohl, H. v., 1855: Über den Bau des Chlorophylls. Bot. Ztg. 13, 89, 105.
- Noack, K. L., 1921: Untersuchungen über die Individualität der Plastiden bei Phanerogamen. Z. Bot. 13, 1.
- Oehlkers, F., 1953: Außerkaryotische Vererbung. Naturw. 40, 78.
- Oltmanns, Fr., 1889: Beiträge zur Kenntnis der Fucaceen. Bibl. Botanica 14.
- Pensa, A., 1910: Alcune formazioni endocellulari dei vegetali. Anat. Anz. 37.
- Perner, E. S., 1952: Zellphysiologische und zytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in *Allium*-Epidermiszellen. Biol. Zbl. 71, 43.
- 1952: Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre physiologische Wirkung auf Zellen höherer Pflanzen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 65, 52.
- Perner, E. S., 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma 42, 457.
- Perner, E. S., und G. Pfefferkorn, 1953: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderungen bei der Isolierung. Flora 140, 98.
- Randolph, L. F., 1922: Cytology of chlorophyll types of maize. Bot. Gazette 73.
- Protoplasma, Bd. XLIII/1—2.

- Renner, O., 1954: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. math.-phys. Kl. Sächs. Akad. d. Wiss. Leipzig 86, 241.
- Rezende-Pinto, M. C. de, 1948: Sur la structure granulaire des chloroplasts d'*Anthoceros*. Portug. Acta Biol. (A), 2, 115.
- 1948: O Problema da origem dos plastidos. Revista Broteria, Sér. de Ciências, Natur. 17, Fasc. I.
- 1948: Sur la structure héliocôidale des chloroplastes. Portug. Acta Biol. (A), 2, 111.
- 1949: Sur la structure héliocôidale des chloroplastes d'*Anthoceros laevis* L. Portug. Acta Biol. Sér. A, 2, Nr. 4.
- 1952: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. Ergebnisse und Probleme. Protoplasma 41, 336.
- Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München.
- Rudolph, K., 1912: Chondriosomen und Chromatophoren. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 30, 605.
- 1912: Das Chondriom der Pflanzenzelle (Vorl. Mitt.). Sitz-Ber. „Lotos“, Prag 60.
- Sapêhin, A., 1911: Über das Verhalten der Plastiden im sporogenen Gewebe. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 29, 491.
- 1913: Untersuchungen über die Individualität der Plastide. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 31, 14.
- 1913: Ein Beweis der Individualität der Plastide (Vorl. Mitt.). Ber. Dtsch. Bot. Ges. 31, 321.
- 1915: Untersuchungen über die Individualität der Plastide. Arch. Zellforschung 13.
- Scherrer, A., 1913: Die Chromatophoren und Chondriosomen von *Anthoceros* (Vorl. Mitt.). Ber. Dtsch. Bot. Ges. 31, 493.
- 1914: Untersuchungen über Bau und Vermehrung der Chromatophoren und das Vorkommen von Chondriosomen bei *Anthoceros*. Flora 107, N. F. 7, 1.
- Schiller, J., 1909: Über die Entstehung der Plastiden aus dem Zellkern (Vorl. Mitt.). Österr. Bot. Z. 59, 89.
- Schimper, A. F. W., 1883: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Bot. Ztg. 41, 105, 121, 137, 153.
- 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. Jahrb. wiss. Bot. 16, 11.
- Schmitz, Fr., 1882: Die Chromatophoren der Algen. Verh. Nathist. Ver. d. preuß. Rheinld. 40.
- Senn, G., 1908: Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzenchromatophoren. Leipzig.
- Stauffacher, H., 1910: Über Chlorophyllkörner und Erythrocyten. Verh. d. schweiz. naturf. Ges. 93, I, 269.
- Steinmann, E., 1952: An electron microscope study of the lamellar structure of chloroplasts. Experimental Cell Res. 3, Nr. 2, 367.
- Strugger, S., 1936: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora 131, 324.
- 1936: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. Flora 131, 113.
- 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. Protoplasma 30, 85.
- 1947: Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. Z. Naturf. 2 b, 146.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Heidelberg.

Strugger, S., 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturw. 37, 166.

— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64, 69.

Wettstein, F. v., 1928: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. Bibl. Genet. 10, 1.

Zimmermann, A., 1890—1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle 1, H. 1—3. Tübingen.

Zirkle, C., 1929: Development of normal and divergent plastid types in *Zea mays*. Bot. Gaz. 88, 186.

Tafel I.

Fig. 1. Proplastiden aus einem sehr jungen, nicht ergrüntem Knospenblatt von *Agapanthus umbellatus*.

Fixation mit 2%iger OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Flächenschnitt durch das Mesophyll, Färbung 9 Std. Rosanilin (gesättigt).

Eine charakteristische Gruppe von Proplastiden und Chondriosomen in einer jugendlichen Mesophyllzelle. Die Proplastiden sind die größeren Gebilde. Ihr Stroma, welches schwächer gefärbt ist, zeigt eine wechselnde Umrissform (Amöboidie). In jedem Proplastid befindet sich das primäre Granum, welches durch stärkere Färbung hervorgehoben ist. Die faden-, stäbchen- und hantelförmigen Chondriosomen sind als schwach gefärbte Gebilde neben den Proplastiden zu erkennen. Sie besitzen keinen stark färbbaren Einschluss.

Objektiv: Apochromat Zeiß 120 n. A. 1,30; Photokular 9× Zeiß, Grünfilter; Miflex, Leica.

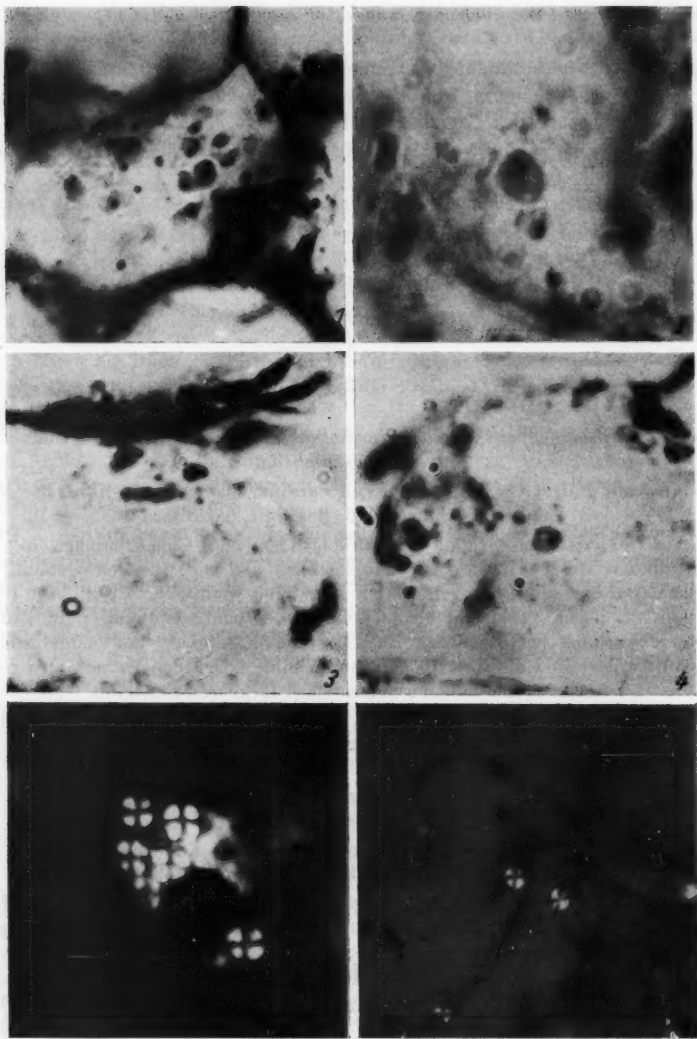
Fig. 2. Proplastiden aus einem jungen, nicht ergrüntem Knospenblatt von *Agapanthus umbellatus*.

Fixation mit 2%iger OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Flächenschnitt durch das Mesophyll, Färbung 9 Std. Rosanilin (gesättigt).

In der Mitte ein ovales Proplastid aus einer Mesophyllzelle mit dem stark gefärbten primären Granum, welches in Seitenansicht deutlich als Scheibchen erkannt werden kann. Das Stroma dieses Proplastids ist wohl infolge der Fixation leicht granuliert, aber wesentlich schwächer färbbar als das primäre Granum. Links neben dem Proplastid und oberhalb desselben sind mehrere typische, völlig homogen erscheinende Chondriosomen zur Abbildung gelangt. Unterhalb des mittleren Proplastids ist ein zweites Proplastid zu erkennen, dessen Granum nicht so scharf eingestellt war.

Objektiv Leitz 1/16 Fluoritimmersion n. A. 1,32, 114fach;
Kompensokular Zeiß 15fach; Miflex, Leica.

Fig. 3. Ergrünendes junges Blatt von *Agapanthus umbellatus* mit weißer Basalzzone, blaß gelbgrüner Mittelzone und grüner Spitzenzone. Flächenschnitt aus der soeben erkennbaren blaß gelbgrünen Mittelzone.



Fixation 2%ige OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Flächenschnitte durch das Mesophyll,
Färbung Fuchsin 1 : 100, 1 Std.

Ein langgestrecktes, lappig geformtes Proplastid mit einem primären Granum in
Flächenansicht. Schräg links oben ein zweites Proplastid mit unscharf eingestelltem
Granum. Daneben rechts ein typisches, diplosomenähnliches Chondriosom, davon
schräg nach rechts unten ein zweites hantelförmiges Chondriosom.

Objektiv 1/12 Ölimmersion Leitz n. A. 1,30; Okular Leitz 10fach; Grünfilter, Panphot.

Fig. 4. Ergrünendes junges Blatt von *Agapanthus umbellatus* mit weißer Basalzzone, blaß gelbgrüner Mittelzone und grüner Spitzenzone. Flächenschnitt aus der soeben erkennbaren blaßgelben Mittelzone.

Fixation 2%ige OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Flächenschnitt durch das Mesophyll, Färbung Fuchsin 1 : 100, 1 Std.

In der Mitte ein scharf eingestelltes Proplastid mit einer im Stroma liegenden Vakuole. Das primäre Granum ist von der Seite zu beobachten. Oberhalb des Proplastids schräg nach rechts und rechts davon diplosomenähnliche Chondriosomen, schräg links vom Proplastid eine Gruppe von Chondriosomen mit rundlicher Gestalt und mit Hantelform.

Objektiv 1/12 Ölimmersion Leitz n. A. 1,50; Okular Leitz 10fach; Grünfilter, Panphot.

Fig. 5. Amyloplastische Proplastiden aus dem Mesophyll eines jungen, 2 cm langen Blattes von *Agapanthus umbellatus*.

Fixation 2%ige OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Säurefuchsinfärbung nach Altmann. Die mit großen Stärkekörnern versehenen Proplastiden sind systrophisch um den dunkel gefärbten Zellkern gelagert.

Polarisationsmikroskopische Aufnahme, Ölimmersion 100fach; Photookular 9fach; Milflex, Leica.

Fig. 6. Amyloplastische Proplastiden aus dem Mesophyll eines jungen, 2 cm langen Blattes von *Agapanthus umbellatus*.

Fixation 2%ige OsO_4 , Einbettung in Paraffin, Säurefuchsinfärbung nach Altmann.

Das linke Proplastid läßt deutlich einen amöboiden Stromafortsatz erkennen.

Polarisationsmikroskopische Aufnahme, Ölimmersion 100fach; Photookular 9fach; Milflex, Leica.

Kurze Mitteilung

Rasche Vakuolen-Kontraktion in *Pulmonaria*-Blütenzellen

Von

Friedl Weber und Griseldis Kenda

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 11. April 1953)

Kenda u. Weber (1952) haben gezeigt, daß die durch Anthozyan rot gefärbten Vakuolen der Epidermiszellen der Blumenkrone von *Cerinth*

major sich auf Zusatz verdünnter Schwefelsäure momentan kontrahieren. Diese Kontraktion läßt sich durch Ammoniak rückgängig machen. *Cerinth* gehört zu der Pflanzenfamilie der Boraginaceen, die durch den Besitz fester (bzw. leicht fest werdender) Zellsäfte ausgezeichnet ist. Die Vermutung war naheliegend, daß an den Vakuolen auch anderer Boraginaceen auf die gleiche Weise eine rasche Kontraktion zu erzielen sein dürfte. Dies war besonders von den Vakuolen der Blütenzellen von *Pulmonaria* zu erwarten, bei denen auch „spontan“ eine Kontraktion eintreten kann (Weber 1933, 1956, Hofmeister 1940). Versuche mit den Blüten von *Pulmonaria officinalis*, *P. stiriaca*, *P. rubra* haben die Richtigkeit dieser Vermutung erwiesen.

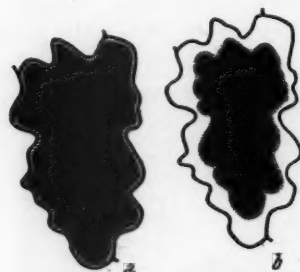


Abb. 1. Epidermiszelle der Blumenkrone von *Pulmonaria rubra*. a in Wasser, b in verdünnter Schwefelsäure. Vakuole schwarz, Plasmasaum punktiert.

Wird zu einem abgezogenen Epidermisstreifen der Blüte von *Pulmonaria rubra* verdünnte Schwefelsäure (p_H 1) zugesetzt, so geht unter den Augen des Beobachters momentan eine ruckartige Kontraktion der Vakuole vor sich. Die Geschwindigkeit dieser Zusammenziehung steht der des Zellsaftes in den Epidermiszellen von *Cerinth* nicht nach. Es kontrahiert sich dabei nicht nur die Vakuole, sondern der ganze Protoplast, d. h. der wandständige Cytoplasmasaum bleibt — von der Vakuole mitgerissen — mit ihr in Kontakt (Abb. 1). Auf Zusatz von Ammoniak ist der Vorgang reversibel.

Wie Weber (1936) beschrieben hat, befindet sich in manchen Epidermis-

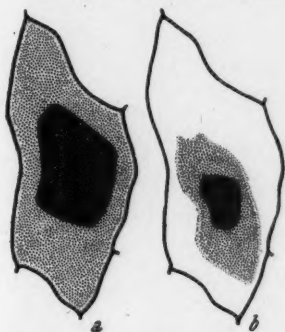


Abb. 2. Epidermiszelle der Blumenkrone von *Pulmonaria rubra*. a in Wasser, b in verdünnter Schwefelsäure. Der Anthozyanophor schwarz, der ihn umgebende Zellsaft grob punktiert, der Cytoplasmasaum fein punktiert.

zellen der Blumenkrone von *Pulmonaria rubra* ein dunkelrot gefärbter Anthozyanophor, der vom lichtrot gefärbten Zellsaft umgeben ist. Dringt in solche Zellen verdünnte Schwefelsäure ein, so erfolgt eine rasche Kontraktion, und zwar sowohl des lichtroten Zellsaftes als auch des dunkelroten Anthozyanophors, der dabei kleiner wird (Abb. 2). Es liegen hier also ganz die gleichen Verhältnisse vor wie bei *Cerinth* (Weber u. Kenda 1953).

Die Vakuolen der Blütenzellen nicht aller Boraginaceen kontrahieren sich auf Zusatz von stark verdünnter Schwefelsäure. So kann man bei den durch Anthozyan blau gefärbten Blütenzellen von *Omphalodes verna* unter Säureeinwirkung zwar eine Verfärbung in Rot erzielen, eine Kontraktion der Vakuole (des Zellsaftes) findet dabei aber nicht statt.

Literatur

- Hofmeister, 1940: Mikrurgische Untersuchungen an Borraginoideen-Zellen I und II. *Protoplasma* 35.
- Kenda und Weber, 1952: Rasche Vakuolenkontraktion in *Cerinth*-Blütenzellen. *Protoplasma* 41.
- Weber, 1955: Vakuolenkontraktion der Borraginaceen-Blütenzellen als Synaerese. *Protoplasma* 22.
- 1956: Vakuolenkontraktion und Anthozyanophoren in *Pulmonaria*-Blütenzellen. *Protoplasma* 26.
- und Kenda, 1955: Zweimalige Vakuolenkontraktion in *Cerinth*-Zellen. *Phyton* 4.

Referate

Anderson, N. G.: Studies on Isolated Cell Components, V. The Effects of Various Solutions on the Nuclear Envelope of the Isolated Rat Liver Nucleus. *Expt. Cell Res.* 4, 306—315 (1953).

In Phosphat-Bicarbonatpuffer enthaltenden, in der Konzentration abgestuften Rohrzuckerlösungen isolierte Zellkerne sind bei Zimmertemperatur phasenmikroskopisch nach Behandlung mit Lösungen von KCl, NaCl, K_2PO_4 (0,001—1,0 mol., p_H 7,0—7,4, $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (0,001—0,25 mol.) auf dadurch auftretende oberflächliche Blasen beobachtet worden. Höhere Zuckerkonzentrationen hemmen die Blasenbildung. Nach Abschätzungen der Lichtbrechung müssen die Blasen relativ impermeabel für Eiweiße sein, können aber vorher aufgenommene Eiweiße enthalten. Ein möglicher Mechanismus der Blasenbildung wird diskutiert.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Leyon, H.: Virus Formation in Chloroplasts. *Exp. Cell Res.* 4, 362—370 (1953);

Leyon, H.: The Structure of Chloroplasts. An Electron Microscopical Investigation of Sections. *Ibid.* 4, 371—382 (1953).

Die elektronenmikroskopische Prüfung läßt aus der engen Beziehung fädiger Elemente des beet yellows virus zu Chloroplasten die Möglichkeit folgern, daß mindestens manche Viruskörper innerhalb von Chloroplasten gebildet werden.

Die andere Arbeit untersucht außer fragmentierten und ganzen Chloroplasten von *Beta saccharifera* und *Aspidistra elatior* auch in Formalin und dann OsO_4 und Cr-Komponenten fixierte und nach Einbetten in Methacrylat dargestellte Schnitte nach Beschattung mit Pd oder Au/Mn 1:1. Es werden weder eine besondere Membran noch die sonst verbreiteten Grana gefunden; letztere sollen nur Lamellenstöße sein, deren große Achse normal zu der langen Achse der Chloroplasten gestellt ist. Die Bilder zeigen auch das Vorkommen angehäufter Assimilate inner- und außerhalb der Chloroplasten.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Romhányi, G.: A vesehámsejtek funkcionális és submikroszkópos szerkezetéről. Sonderdruck aus: *Kísérletes Orvostudomány* 1953.

Epithelzellen der proximalen und distalen gewundenen Tubuli der Niere werden nach den polarisationsoptischen Untersuchungen von einem micellaren Lipoproteinnetzwerk durchdrungen, dessen Lage, leptonischer Bau und Funktion bei der von Phosphatase regulierter Filtertätigkeit geschildert werden. Für wesentlich wird die molekular-elektrische Konfiguration gewisser Teile des Substrats gehalten. (Auf einschlägige Ergebnisse der Kellerschen Schule wird leider nicht eingegangen.)

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

- Wohlfarth-Bottermann, K. E., F. Krüger und K. G. Grell: Protistenstudien VI. Die Feinstruktur der Axopodien und der Skelettnadeln von Heliozoen. (Zugleich ein Beitrag zur sublichtmikroskopischen Struktur des Protoplasmas) 23. 4. 1953
- Hilmbauer, K.: Zellphysiologische Studien an Euglenaceen, besonders an *Trachelomonas* 5. 5. 1953
- Millié, D.: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis* 12. 5. 1953
- Umrath, K.: Über die elektrische Polarisierbarkeit von *Nitella mucronata* und *Nitella opaca* 1. 6. 1953
- Freytag, K.: Der submikroskopische Bau der Deckhaare von *Lamium galeobdolon* Crantz 15. 6. 1953
- Saguehi, S.: On the Fundamental Structure of Protoplasm 27. 6. 1953
- Imazumi, T.: Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. I. La variation du volume de l'embryon . . 30. 6. 1953
- Imazumi, T., et Y. Kimoto: Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. II. Les éléments et les propriétés. 30. 6. 1953
- Imazumi, T.: Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. III. La variation de la charge électrique 30. 6. 1953
- Hofmeister, L.: Mikrurgische Untersuchung über die geringe Fusionseigung plasmolysierter, nackter Pflanzenprotoplasten 4. 7. 1953
- Diskus, A., und O. Kiermayer: Die Raphidenzellen von *Hemaria discolor* bei Vitalfärbung 23. 7. 1953
- Kinzel, H.: pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen 23. 7. 1953
- Krebs, Inge: Beobachtungen über das Plasmolyseverhalten von *Spirotaenia condensata* Bréb. 23. 7. 1953
- Kelly, J. W.: Metachromacy in the Eggs of Fifteen Lower Animals 24. 8. 1953
- Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien I. (Zur sublichtmikroskopischen Struktur des Cytoplasmas und zum Nachweis seiner „Partikelpopulationen“) 5. 9. 1953
- Weber, P.: Kakteen-Virus-Übertragung durch Pfropfung 26. 9. 1953
- Umrath, K.: Über das elektrische Potential und den Aktionsstrom von Eierstockeiern von *Rana esculenta* 29. 9. 1953
- Germ, H.: Plastidenzerfall in den Epidermiszellen von *Cephalanthera*-Arten 8. 10. 1953
- Gross, P. R.: On the Mechanism of the Yolk-Lysis Reaction 17. 10. 1953
- Badenhuizen, N. P.: Some Observations on Removable Spirals in *Scilla ovatifolia* Bak. 22. 10. 1953
- Pisek, A. und W. Larcher: Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen 6. 11. 1953
- Pfeiffer, H. H.: Vorläufige Versuche über die Elastizität des Atraktoplasmas 2. 12. 1953
- Biehl, R.: Zellwandpermeabilität einiger Moose 16. 12. 1953
- Scheidt, W.: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum* 23. 12. 1953

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Österreichische botanische Zeitschrift

Herausgegeben von

L. Geitler, Wien

Zuletzt erschien:

Band 100, 4. und 5. (Schluß-) Heft. Ausgegeben im November 1953)

Mit 236 Textabb. 242 Seiten. 1953. S 238.—, DM 39,80, \$ 9,50, sfr. 40,80

Inhaltsverzeichnis: Abhandlungen: K. H. Rechinger, *Cousinia*-Studien. — Mme Jacqueline Nicot, Un *Helminthosporium* saprophyte du sol: *Helminthosporium spiciferum* (BAIN.) nov. comb. — Pierre Fusey, Quelques Diatomées rares ou nouvelles de France. — M. Serpette, Note sur une Cyanophycée de la zone supralittorale: *Symploca atlantica* GOM. — G. Georges, Une station française de *Phyllocardium complanatum* KORSHIKOV. — P. Bourrelly et G. Georges, Quelques Algues rares ou nouvelles d'un Étang de Rambouillet (Ferme Nationale). — Jean et Geneviève Feldmann, Observations sur les Genres *Dermocarpa* et *Dermocarpella* (Cyanophyceae). — Marius Chadeaud, Les hyphes à anses latérales des Eumycètes et les affinités floridéennes de ces Champignons. — P. Bourrelly, Flagellés incolores rares ou nouveaux. — P. Guermeur et E. Manguin, Note sur quelques Diatomées rares ou nouvelles. — Friedl Weber, Viruskrankes Epiphyllum. — Erhard Schmied, Spurenelementdüngung und Wasserhaushalt einiger Kulturpflanzen. — Bruno Mack, Untersuchungen an Chrysophyceen IV. Zur Kenntnis von *Hydrurus foetidus*. — F. Ehrendorfer, Systematische und zytogenetische Untersuchungen an europäischen Rassen des *Achillea millefolium*-Komplexes. — Herma Baum-Leinfellner, Ergänzende Mitteilungen zum Problem der unifazialen Kelchblattspitzen. — Walter Leinfellner, Die hypopeltaten Brakteen von *Peperomia*. — F. Ehrendorfer, Ökologisch-geographische Mikro-Differenzierung einer Population von *Galium pumilum* MURR. s. str. — Walter Leinfellner, Die „schildförmigen“ Laubblätter von *Melaleuca micromera* SCHAU. — Elisabeth Tschermak-Woess und Gertrude Hasitschka, Über Musterbildung in der Rhizodermis und Exodermis bei einigen Angiospermen und einer Polypodiaceae. — Brigitte Schittengruber, Stomata auf weißen Blatflecken. — F. E. Fritsch, The Annual Cycle of a Phormidium-Stratum. — Kurze Mitteilungen: K. H. Rechinger, Beiträge zur Kenntnis von *Rumex*. XI. — Friedrich Ehrendorfer, *Galium noricum* EHREND., eine neue Art der Ostalpen. — Lothar Geitler, Das Bewegungsverhalten von *Porphyridium cruentum* am natürlichen Standort. — *Besprechungen.*

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Lehrbuch der Pflanzenphysiologie

Soeben erschienen:

II. und III. Band: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze.

Von Dr. Erwin Bünning, o. Professor an der Universität Tübingen.

Dritte Auflage. Mit 479 Abbildungen. XII, 539 Seiten. 1953.

DM 49,60, Ganzleinen DM 54,60

Die Neuauflage unterscheidet sich wesentlich von der älteren, die 1948 erschien. Das rasche Fortschreiten der Forschung zwang in mehreren Abschnitten zu einer völligen Neubearbeitung, ganz besonders gilt das für den Abschnitt über die inneren Faktoren der Differenzierung. Viele Abbildungen sind, teilweise als Ersatz für einige der älteren, neu hinzugekommen.

Laboratoriumsdiagnose menschlicher Virus- und Rickettsieninfektionen

Ein Leitfaden. Von Dr. med. Wilhelm Klöne, Laboratorium der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf. Mit 10 Abbildungen. VII, 161 Seiten. 1953. DM 16,80

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

